

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090437 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.08

(22) Дата подачи заявки
2018.08.02

(51) Int. Cl. *A61K 36/53* (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/132 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)

(54) СИНЕРГЕТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОМОТОРА АУТОФАГИИ

(31) 102017000089680

(32) 2017.08.03

(33) IT

(86) PCT/EP2018/071005

(87) WO 2019/025548 2019.02.07

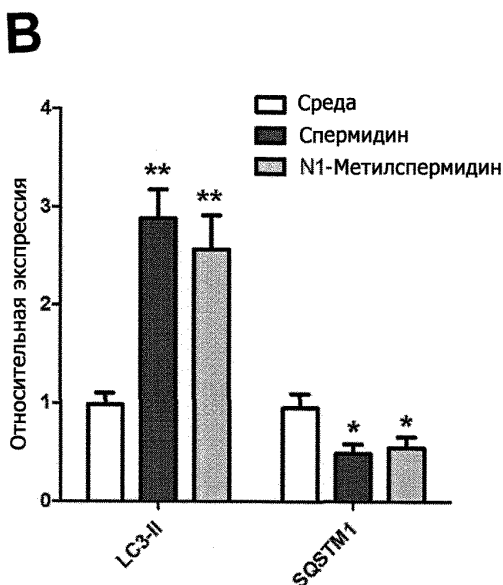
(71) Заявитель:
ДЖУЛИАНИ С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Джулиани Джаммария (CH), Паус
Ральф (DE), Гримальди Бенедетто,
Марцани Барбара, Барони Серджио
(IT)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к синергетической композиции, включающей сухой экстракт растения рода *Galeopsis* и соединение, промотирующее аутофагию, выбранное из биотина и R-N¹-спермидина или его соли, в которых R представляет собой водород или метил, и их смесей. Синергетические композиции согласно изобретению могут находиться в форме топического препарата или перорального препарата и применяться в качестве промотора аутофагии особенно в клетках волосяных фолликулов скальпа человека и при промотировании роста волос и/или при лечении истончения волос или потери волос.



202090437 A1

202090437

A1

СИНЕРГЕТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОМОТОРА АУТОФАГИИ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к синергетическим композициям и их применению в качестве промотора аутофагии в пищевой, медицинской или косметической областях техники.

Уровень техники

Аутофагия (или аутофагоцитоз) является естественным регулируемым механизмом клетки, который разбирает ненужные или дисфункциональные компоненты. Аутофагия допускает организованную деградацию и рециклинг клеточных компонентов. При макроаутофагии таргетированные циклоплазматические составляющие выделяются из остатка клетки в двухмембранной везикуле, известной как аутофагосома. Аутофагосома в конечном счете сливается с лизосомами, и содержимое разрушается и возвращается в оборот. Обычно описываются три формы аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (СМА), наряду с миофагией. При заболевании аутофагия рассматривается как адаптивный ответ на стресс, который способствует выживанию, в то время как в других случаях оказывается, что он способствует гибели и заболеваемости клеток. В крайнем случае голодания разрушение клеточных компонентов способствует выживанию клеток, поддерживая клеточный энергетический уровень.

Следовательно, аутофагия играет ключевую роль в таких основных клеточных процессах, регулирующих здоровье, заболевание и старение, как адаптивные ответы на стресс, дифференцировка, развитие тканей и гомеостаз.

В работе Angeleen Fleming et al. “Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics”, *Nature Chemical Biology*, 7, 9–17 (2011), авторы показали, что аутофагия имеет неожиданные плеiotропные функции, которые благоприятствуют выживанию клеток, включая снабжение питательными веществами при голодании, очистку внутренней части клетки, защиту от инфекции и представление антигенов. Поэтому недостаточная аутофагия ассоциируется с рядом различных болезненных состояний, включая нейродегенерацию, рак и болезнь Крона.

В работе Teng Yu et al. “Targeting autophagy in skin diseases”, *J. Mol. Med.* (2015), 93: 31-38” исследуются и описываются механизмы аутофагии в патогенезе кожных заболеваний. Конкретно сообщается о роли аутофагии при аутоиммунных кожных воспалениях, таких как псориаз, системная красная волчанка (SLE) и витилиго, инфекционных кожных воспалениях, раковых кожных заболеваниях, таких как

сквамозная клеточная карцинома и меланома.

Для того чтобы терапевтически модулировать аутофагию для исследования супрессоров и индукторов аутофагии, исследуют модели человеческих органов.

В работе Tobias Eiserberg et al. "Induction of autophagy by spermidine promotes longevity", Nature cell biology, volume 11, number 11, November 2009, исследуют действие природного полиамина спермидина на дрожжах, мухах и червях. Авторы сообщают, что введение спермидина продлевает их жизнь. Кроме того, введение спермидина возможно ингибирует окислительный стресс у стареющих мышей. Показано, что аутофагия составляет основной путь лизосомной деградации для рециклинга поврежденного и потенциально вредного клеточного материала.

Авторы изобретения поняли, что в качестве полных циклически ремоделированных (мини)органов фолликулы волос скальпа человека (HF) могут предоставить такую модель, так как такие фолликулы после активности массового роста (анагена) спонтанно вступают в инволюцию органа, управляемую апоптозом (катаген). Как известно, жизненный цикл волосяной луковицы или фолликула по существу представлен тремя последовательными фазами: анагеном (рост), катагеном (инволюция) и телогеном (фаза покоя).

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что жизненный цикл волосяного фолликула можно модулировать механизмом аутофагии, и на основе модели фолликулы волоса скальпа человека исследовали способствующие агенты.

В связи с исследованием, авторы изобретения выдвинули гипотезу, что HF скальпа в поздней стадии анагена, эпителий матрикса волос которых пролиферирует с более высокой скоростью, чем большинство злокачественных опухолей, и подвергается воздействию ряда стрессоров, подвергаются возрастающему давлению для поддержания тканевого гомеостаза и могут требовать существенного потока аутофагии для их потока для поддержания их роста.

Как известно, различные стрессоры отрицательно влияют на жизненный цикл волосяного фолликула, определяя таким образом уменьшение числа волос и их истончение.

Поэтому целью настоящего изобретения является композиция, подходящая в качестве промотора аутофагии в клетках волосяных фолликулов скальпа человека.

Следовательно, другой целью является композиция для способствования росту волос и/или ингибирования или замедления потери волос скальпа человека.

Другой целью является композиция для лечения состояний, опосредуемых аутофагией.

Сущность изобретения

Начав с исследования органной культуры волосяных фолликулов скальпа человека (HF), авторы изобретения нашли комбинацию соединений, вызывающих аутофагию в исследуемой модели и показывающую синергетический эффект при промотировании аутофагии, особенно в клетках скальпа человека в волосяных фолликулах.

После исследования композицией, имеющей синергетический эффект, неожиданно стал экстракт растения рода *Galeopsis* в комбинации с другим соединением, промотирующем аутофагию особенно в клетках скальпа человека, выбранным из R-N¹-спермидина или его соли, биотина и их смеси.

Следовательно, указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis* и R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород или метил.

С другой стороны, указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis* и биотин.

В другом альтернативном воплощении указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis*, биотин и R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород.

Предпочтительно и неожиданно авторы изобретения обнаружили, что введение указанных выше композиций топическим или пероральным путем введения синергетически промотирует аутофагию в клетках, в особенности, волосяных фолликулах, у субъекта, страдающего от поредения волос, определяя таким образом прогрессирующую густоту волос в пострадавших участках скальпа.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение следовательно предоставляет применение указанных выше композиций для стимуляции физиологического роста волос. Согласно еще одному аспектом, настоящее изобретение следовательно предоставляет указанные выше композиции для применения при лечении или предупреждении потери волос или болезни волосистой части головы.

Описание фигур

Фигура 1 показывает характерные изображения клеток U2OS, трансдуцированных конструкцией, экспрессирующей аутофагический белок LC3, слитый с красным флуоресцентным белком (RFP), обработанных 6 часов указанными веществами. Ранее охарактеризованный индуктор аутофагии спермидин используют в качестве положительного эталона.

Фигура 2 показывает характерные изображения клеток U2OS, трансдуцированных конструкцией, экспрессирующей белок SQSTM1/p62, слитый с красным флуоресцентным

белком (RFP), обработанных 6 часов указанными веществами. Оборот SQSTM1/p62 зависит главным образом от опосредуемого аутофагией процесса деградации.

Фигура 3 показывает уровни липидированного LC3 и SQSTM1 в человеческих клетках U2OS, обработанных эквимоллярными дозами N1-метилспермидина и спермидина, как описано в примере 14.

Подробное описание изобретения

Следовательно, изобретение относится к синергетической композиции, определенной в п.1. В предпочтительном и преимущественном воплощении изобретение относится к синергетической композиции экстракта растения рода *Galeopsis*, R-N¹-спермидина или его соли, в которых R представляет собой водород или метил, и биотина.

Экстракт композиции указанных выше композиций имеет происхождение из растения, принадлежащего к роду *Galeopsis*.

В одном воплощении экстракт *Galeopsis* представляет собой сухой экстракт, в частности, вида *Galeopsis segetum*, обычно известного как пикульник пушистый (*Downy Hemp-nettle*), т.е. вида цветущего растения в семействе яснотковых *Lamiaceae*.

В другом воплощении экстракт *Galeopsis* представляет собой экстракт, в частности, вида пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit*).

Экстракт по изобретению получают путем экстрагирования из части растения, такой как корни, листья, плоды и цветы, предпочтительно воздушных частей растения. Согласно некоторым воплощениям, экстракт растения по изобретению получают путем экстрагирования из части растения или его ткани с использованием физиологически приемлемого растворителя в качестве экстрагирующей среды.

Термином «физиологически приемлемый растворитель» обозначают растворитель, который не вызывает значительных вредных реакций, когда вводится в организм человека или применяется к организму человека. Типично термином «растворитель» обозначают растворитель, используемый для экстрагирования биологически активных компонентов из части растения *Galeopsis*.

Подходящим растворителем для получения экстракта растения является физиологически приемлемая жидкость, в которой растворяются по меньшей мере некоторые из физиологически активных компонентов выбранного растения, и в которой они не претерпевают изменения, которое лишает их активности.

Предпочтительными морфологическими частями растения, используемыми для осуществления экстрагирования, является растущая система, которая включает стебли, листья, распускающиеся цветки и цветки.

Растворитель, используемый для осуществления экстрагирования, может

представлять собой физиологически приемлемый растворитель. Подходящими растворителями могут быть неполярные растворители, такие как диэтиловый эфир, хлороформ, полярные апротонные растворители, такие как этилацетат, дихлорэтан, и полярные протонные растворители, такие как спирты C₁-C₆ и содержащие их водные растворы. Предпочтительно использование полярных протонных растворителей. Типичные полярные протонные растворители включают воду, этанол, пропанол, изопропиловый спирт и их смеси. Предпочтительными растворителями являются вода и этиловый спирт и их смеси.

В некоторых воплощениях после экстрагирования полярным протонным растворителем, предпочтительно этанолом, экстракт предпочтительно фильтруют, концентрируют и осветляют. Затем полученный экстракт предпочтительно очищают. Очистку предпочтительнее осуществляют путем элюирования растворителем из колонки. Растворителем может являться, например, вода или этанол. Затем очищенный экстракт предпочтительно концентрируют и сушат. Полученный таким образом сухой экстракт можно, необязательно, измельчить и, необязательно, добавить эксципиенты, и получить конечный сухой экстракт, который используют в композициях по изобретению. Необязательные эксципиенты, включаемые в сухой экстракт, предпочтительно выбирают из группы, включающей мальтодекстрин и коллоидный безводный силикагель.

Для того чтобы получить экстракт *Galeopsis tetrahit*, для выделения/экстрагирования одного или нескольких биологически активных компонентов из растительных тканей растения можно использовать методы экстракции в системе твердое тело – жидкость.

В некоторых воплощениях экстрагирование одного или нескольких биологически активных компонентов происходит путем вымачивания растительной части или матрикса *Galeopsis tetrahit* в подходящем растворителе, указанном выше.

Например, подходящий экстракт можно получить путем окунания или вымачивания некой доли воздушных частей *Galeopsis* в смеси этанол-вода в течение времени, подходящего для обогащения растворителя одним или несколькими биологически активными компонентами, содержащимися в этой доле растения. В таких условиях происходит экстрагирование биологически активных компонентов из растительных тканей выбранного растения, по существу, за счет диффузии и/или осмоса. Время вымачивания долей растения в растворителе изменяется, например, от 1 до 48 часов.

В соответствии с некоторыми воплощениями, сухой экстракт *Galeopsis* можно получить с помощью следующих стадий:

- измельчение по меньшей одной части растения *Galeopsis*;
- экстрагирование растворителем, предпочтительно физиологически приемлемым растворителем;
- фильтрация экстракта;
- очистка фильтрованного экстракта, предпочтительно путем элюирования растворителем из колонки;
- сушка очищенного экстракта;
- измельчение высушенного очищенного экстракта.

В некоторых воплощениях стадию экстрагирования можно повторять два или три раза.

Когда растворитель удаляют, например, выпариванием, необязательно можно добавить твердый носитель или эксципиент, такой как, например, без ограничения, крахмалы или мальтодекстрины, и получить экстракт в форме сухого порошка.

Типично экстракт, полученный из *Galeopsis tetrahit* или *segetum*, может быть жидким, густым или сухим, и предпочтительно представляет собой сухое вещество.

Например:

- в жидком экстракте 1 мл экстракта содержит биологически активные компоненты, растворенные в 1 г растительного лекарственного средства;
- в густом экстракте растворитель частично выпарен, в частности, до тех пор, пока экстракт не увлажняет фильтровальную бумагу;
- в сухом экстракте растворитель выпарен почти полностью с образованием порошка.

Можно получить экстракты *Galeopsis* различной полярности.

Например, можно получить экстракт высокой полярности с использованием полярного растворителя, такого как водно-спиртовой раствор, экстракт промежуточной полярности с использованием менее полярного растворителя, такого как этилацетат, или неполярный экстракт с использованием сверхкритического CO₂, которым можно экстрагировать фракции активных фитокомплексов.

В некоторых воплощениях экстрагирование выполняют, используя массовое соотношение между растворителем и растительным матриксом, колеблющееся от 1:10 до 10:1.

Возможно экстрагировать биологически активные компоненты из растения *Galeopsis*, используя другие методы экстрагирования, такие как, например, путем гидролиза, инфузии, сжатия, отваривания, перколяции, противоточное экстрагирование, экстрагирование в аппарате Сокслета, экстрагирование сверхкритическими газами или с

помощью ультразвука.

Кроме экстракта растения синергетическая композиция может включать R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород или метил. Спермидин представляет собой полиамин, имеющий по номенклатуре ИЮПАК название N¹-(3-аминопропил)бутан-1,4-диамин. Спермидин может присутствовать в композиции в форме соли, предпочтительно фармацевтически приемлемой соли, предпочтительнее в форме тригидрохлорида.

Кроме экстракта растения синергетическая композиция может включать биотин – водорастворимый витамин B, также называемый витамином B7 и известный ранее как витамин H или кофермент R.

Биотин состоит из цикла уреидо, слитого с тетрагидротиофеновым циклом, имея по номенклатуре ИЮПАК название 5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил]пентановая кислота (номер CAS 58-85-5).

Авторы изобретения впервые показали свойство биотина быть промотором аутофагии в клетках человека, конкретно, клетках волосяных фолликулов скальпа человека.

Поэтому изобретение также относится к биотину или композиции, содержащей биотин согласно любому из воплощений, описанных выше, для применения в косметической или пищевой отрасли или медицине в качестве промотора аутофагии при лечении заболеваний, модулируемых аутофагией.

Заболевания, модулируемые аутофагией, выбирают, например, из группы, включающей нейродегенерацию, рак, болезнь Крона и кожные заболевания. Конкретно из кожных заболеваний можно назвать аутоиммунные воспаления кожи, такие как псориаз, системная красная волчанка (SLE) и витилиго, инфекционные воспаления кожи, раковые воспаления кожи, такие как сквамозно-клеточная карцинома и меланома.

Впервые экстракт растения рода *Galeopsis*, предпочтительно вида *Galeopsis segetum* и *Galeopsis tetrahit*, использован как промотор аутофагии при лечении кожных заболеваний.

Предпочтительно, и неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что введение вышеуказанных композиций, типично топическим или пероральным путем введения, синергетически промотирует аутофагию в клетках волосяных фолликулов скальпа человека у субъекта, страдающего от истончения волос, определяя таким образом прогрессирующую густоту волос в пострадавших участках скальпа

Типично композиция по изобретению включает физиологически и/или фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Физиологически или фармацевтически подходящий носитель, разбавитель или эксципиент можно выбрать, основываясь на пути введения, для которого предназначена получаемая фармацевтическая композиция. Любой носитель и/или эксципиент, подходящий для желательной формы препарата для введения, рассматривается в применениях экстракта растения или его активных ингредиентов, описанных в настоящем описании.

В рамках настоящего изобретения термин «носитель» относится к эксципиенту, среде, разбавителю или адьюванту, который может или не может присутствовать в композиции по изобретению.

Композицию по изобретению можно составить в форме для топического применения или в форме для перорального введения.

В некоторых воплощениях композиция является композицией для топического применения. При таком применении композицию по изобретению можно применить, в эффективном количестве, непосредственно к скальпу или коже человека.

Например, при лечении потери волос или форм истончения косметически/физиологически активное количество композиции можно наносить непосредственно на скальп один или несколько раз в день, обычно курсами, длящимися 2-3 месяца, чередующимися с периодами отсутствия лечения.

Согласно таким аспектам, изобретение также относится к косметическому методу лечения, включающему нанесение на скальп или его часть эффективного количества композиции согласно одному или нескольким воплощениям, описанным и/или заявленным в настоящей заявке.

Количество сухого экстракта *Galeopsis*, предпочтительно в форме вида *Galeopsis segetum* или *Galeopsis tetrahit*, в топическом препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,0003–0,01 мас.% относительно общей массы препарата.

Количество биотина в топическом препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,0006–0,075 мас.% относительно общей массы препарата.

В топической форме композиция предпочтительно включает N¹-метилспермидин. В топической форме N¹-метилспермидин или спермидин предпочтительно включен в интервале 0,0005–0,1 мас.% относительно общей массы препарата.

Из обычных эксципиентов в топическом препарате для косметического применения или для фармацевтического применения можно назвать консерванты, антибактериальные вещества, эмульгаторы, буферы, лубриканты, смачивающие вещества, кондиционеры и красители.

Композиция для топического применения может находиться в твердой,

полутвердой или жидкой форме. Подходящие препараты в твердой форме включают кремы, гели, мази, пасты.

В других воплощениях препарат для местного введения находится в жидкой форме, например, в форме лосьонов, гелей, шампуней, суспензий, эмульсий.

В случае препаратов в жидкой или полутвердой форме экстракт растения может быть разбавлен в носителе в физиологически приемлемой жидкой форме, такой как вода, водно-спиртовой раствор или раствор глицерина, или смешан с другими жидкостями, подходящими для местного нанесения.

Как пример, композиции по изобретению в жидкой форме можно получить путем растворения компонентов в воде и/или спирте. Жидкую композицию можно забуферить для достижения интервала pH, обычно выбранного от 5 до 7 для совместимости с pH скальпа, и затем отфильтровать и упаковать в подходящие контейнеры, такие как пузырьки или флаконы.

В некоторых воплощениях композиции по изобретению могут включать эксципиенты, обычно используемые при составлении косметических или фармацевтических препаратов для местного применения, такие как консерванты, антибактериальные вещества, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, смачиватели, красители и другие эксципиенты, обычно используемые в методах получения.

В одном воплощении препарат для местного применения находится в форме эмульсии, содержащей экстракт в подходящем эксципиенте. В некоторых воплощениях композиция для топического применения включает эксципиент типа гидроксиметилцеллюлозы и/или загуститель с ГЛБ, подходящим для препарата и веществ.

Согласно другим воплощениям, композиция по изобретению находится в форме для перорального введения. В таких случаях композиция содержит компоненты, определенные ранее, и один или несколько носителей или эксципиентов, подходящих для перорального введения.

Количество экстракта *Galeopsis*, предпочтительно в форме вида *Galeopsis segetum* или *Galeopsis tetrahit*, в пероральном препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,1–20 мг на одну дозу.

Количество биотина в пероральном препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,03–0,08 мг на одну дозу.

В пероральной форме композиция включает предпочтительно спермидин или его соль, предпочтительнее спермидин в форме соли.

В пероральной форме N¹-метилспермидин (или его соль) или спермидин (или его соль) предпочтительно включен в интервале 0,3 – 0,8 мг на одну дозу.

Как пример, подходящие эксципиенты для перорального введения включают производные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиэтилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, ацетобутират целлюлозы, ацетофталат целлюлозы и их смеси.

Другие примеры подходящих эксципиентов включают полимеры, принадлежащие к семейству лактамов, такие как пирролидон и его производные, например, поливинилпирролидон, поливинилполипропилпирролидон и их смеси, неорганические соли, такие как фосфат кальция или дикальцийфосфат, лубриканты, такие как стеарат магния, триацилглицерины и их смеси.

Композиции для перорального введения могут находиться в твердой или жидкой форме. Типичные композиции в твердой форме включают таблетки, капсулы, порошки, гранулы, пилули. Примеры композиций в жидкой форме включают растворы, эмульсии, суспензии, сиропы. Композиции также могут находиться в форме с регулируемым высвобождением содержащихся в них активных компонентов.

Таблетки обычно включают подходящий носитель или эксципиент, в котором распределен экстракт растения, типично в сухой форме.

Из типичных эксципиентов или носителей для перорального введения в состав композиции могут быть включены дезинтеграторы, наполнители, консерванты.

В некоторых воплощениях композиция по изобретению представляет собой пищевой продукт, диетический продукт или нутрицевтический продукт.

Термин «пищевая добавка» обозначает продукт, который улучшает питательный статус и может быть использован для поддержания или улучшения функциональной активности одного или нескольких органов или функциональности человеческого организма в физиологических границах. Композиции по изобретению, будучи промоторами аутофагии, являются поэтому способствующими росту волос нутрицевтиками и косметическими средствами.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению описанных выше синергетических композиций для стимуляции физиологического роста волос и/или для лечения от потери волос.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению топического или перорального препарата, включающего описанные выше композиции, для стимуляции физиологического роста волос.

Согласно еще одному аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к описанным выше синергетическим композициям для применения в качестве промотора

аутофагии в клетках волосяных фолликулов скальпа человека при лечении и предупреждении потери волос и для стимуляции роста волос.

Согласно другому специфическому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению топического или перорального препарата, включающего описанные выше композиции, для стимуляции роста волос или для лечения или предупреждения потери волос.

Связь между промотированием аутофагии и упомянутыми выше активностями композиций по изобретению доказывается испытаниями, описанными в приведенном далее примере 13. В частности, в научной статье Chiara Parodi et al.: “Autophagy is essential for maintaining the growth of a human (mini)organ: Evidence from scalp hair follicle organ culture”, опубликованной в PLOS Biology, vol. 16(3), 2018, 28. Mar: 10.1371/journal.pbio.2002864, показано, что испытание, выполненное на эпителиальных клетках остеосаркомы человека, является установленной моделью для доказательства эффективности композиции при стимуляции роста волос.

Эксперимент показывает синергизм при стимуляции аутофагии на проверенной модели *in vitro*. Результаты и публикация показывают, что аутофагия необходима для роста волосяного фолликула. Композиция по изобретению стимулирует аутофагию и, следовательно, является эффективной при стимуляции роста волос.

В некоторых аспектах изобретение относится к описанной выше композиции для применения при лечении расстройств роста волос, таких как в случае андрогенной алопеции или облысения.

В другом аспекте изобретение относится к применению описанных выше композиций в качестве промотора аутофагии при лечении воспаления кожи.

Авторы изобретения также обнаружили, что композиция, включающая N-метилспермидин и биотин, подходит в качестве промотора аутофагии при лечении кожных заболеваний.

Вводимые количества и частота введения композиции будут зависеть от типа и тяжести заболеваний, от которых лечат.

Теперь изобретение будет описано подробнее с обращением к конкретным воплощениям, показывающим синергетические результаты, достигаемые композициями по изобретению, но не должны рассматриваться как ограничивающие. Количество указанных компонентов выражаются в массовых (мас./мас.) процентах (%) или в мг на одну дозу для введения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЧАСТИ

Пример 1

Получение экстракта *Galeopsis segetum*

Получение сухого экстракта *Galeopsis segetum* выполняют путем экстрагирования 40% этанолом с последующей очисткой на колонке. Стадии описаны в последующих разделах.

Экстрагирование

Измельченные высушенные воздушные части *G. segetum* экстрагируют дважды при 50°C в течение 2 часов 40% этанолом. Твердое вещество и жидкость разделяют с помощью декантатора.

Жидкие экстракты фильтруют, концентрируют в вакууме и затем осветляют центрифугированием.

Очистка

Колонку заполняют ионообменной смолой-сорбентом XAD7HP, которую предварительно замачивают в 95% этаноле и выдерживают в течение 10 часов. Затем набитую колонку промывают водой, продолжая промывание до тех пор, пока проводимость элюата не достигнет такой же величины, как у загружаемой воды.

Очистку экстракта выполняют на колонке, набитой XAD7HP, с элюированием сначала водой и затем 70% этанолом.

Собранные элюаты концентрируют в вакууме.

К концентрированному раствору добавляют этанол, и затем раствор греют при 70-75°C в течение 30 минут для того, чтобы снизить уровень бионагрузки.

Раствор снова концентрируют в вакууме, сушат при 50°C в течение 24 часов, и затем остаток измельчают и смешивают с эксципиентами (смесью мальтодекстрина и коллоидного безводного силикагеля 90/10), и получают конечный продукт.

Пример 2

Получение экстракта *Galeopsis tetrahit*

Получение сухого экстракта *Galeopsis tetrahit* выполняют, точно следуя процедуре, описанной в предыдущих абзацах для экстрагирования *Galeopsis segetum*.

Пример 3

Оздоровливающий шампунь

Ингредиенты	%, масс./масс.
Zetesol MGS/B	16–49
Лауроилсаркозинат натрия	4–12
Mirasheen CP 820/G	2–6
Rewoderm LI S 80	1–4
Euxyl K 701	1–2

BC 2262	0,5–1,4
Кокамид МРА	0,5–1,4
Калий-ундециленоил-гидролизованный белок пшеницы	0,5–1,4
Моногидрат лимонной кислоты	0,4–1,2
Моногидрат бетаина	0,2–0,7
Хлорид лаурилметилглюцит-10-гидроксипропилдимония	0,2–0,7
Gafquat 755 N-O	0,2–0,5
D-Пантенол	0,1–0,3
Тринатрия этилендиамин дисукцинат	0,1–0,3
ВНА	0,01–0,02
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,003–0,009
Биотин	0,001–0,03
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
N ¹ -Метилспермидин	0,0005–0,1
Лецитин	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
Вода до 100 мл	
Пример 4	
Укрепляющий шампунь	
Ингредиенты	%, масс./масс.
Zetesol MGS/B	15–60
N-Лауроилсаркозинат натрия	4–12
Mirasheen CP 820/G	2–6
Rewoderm LI S 80	1–4
Euxyl K 701	1–2
Кокамид МРА	0,5–1,4
Калий-ундециленоил-гидролизованный белок пшеницы	0,5–1,4
Моногидрат лимонной кислоты	0,4–1,1
BC 2262	0,3–0,8
Моногидрат бетаина	0,2–0,7
Хлорид лаурилметилглюцит-10-гидроксипропилдимония	0,2–0,7
Abil Soft AF 100	0,2–0,6
Gafquat 755 N-O	0,2–0,5
D-Пантенол	0,1–0,3

Тринатрия этилендиамин дисукцинат	0,1–0,3
ВНА	0,01–0,02
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,003–0,009
Биотин	0,001–0,003
Meditanox H-10	0,001–0,002
N ¹ -Метилспермидин	0,001–0,002
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005

Вода до 100 мл

Пример 5

Лосьон

Ингредиенты	%, мас./мас.
Этанол	9–27
Пантотенат кальция	1–2
ПЭГ-40-Гидрогенизированное касторовое масло	1–2
Молочная кислота, 80% p-p	0,1–0,4
Lyrobelle soyaglycone	0,04–0,13
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,03–0,1
N ¹ -Метилспермидин	0,03–0,09
Лецитин NAT 8539	0,02–0,07
Октадецил-ди-трет-бутил-4-гидроксигидроциннамат	0,02–0,07
Fomblin HC/PU-CAT5	0,009–0,027
Биотин	0,007–0,022
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
Вода до 100 мл	

Пример 6

Укрепляющий кондиционер

Ингредиенты	%, мас./мас.
Хлорид цетилтриметиламмония	3–9
Цетилстеариловый спирт	3–8
Silsoft 8812	2–7
Арлацел 165-PA-(MV)	2–5
Глицерилстеарат	2–5
Алкиллактат C12-13	1–3

Dow Corning CE 8401	1–2
Ксилит	1–2
Bioscontrol synergy BAS	0,3–0,9
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,3–0,9
D-Пантенол	0,3–0,8
Униглюкан G-51	0,3–0,8
Жидкая молочная кислота	0,1–0,4
Фитантриол	0,1–0,3
Бензоат натрия	0,1–0,3
Дегидроацетат натрия	0,1–0,3
Циклопентасилоксан	0,1–0,2
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,1–0,2
Серицин	0,1–0,2
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0–0,01
Биотин	0,01–0,03
Meditinox H-10	0,001–0,002
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
N ¹ -Метилспермидин	0,025–0,075
Вода до 100 мл	

Пример 7

Укрепляющий кондиционер	
Ингредиенты	%, мас./мас.
Цетостеариловый спирт	4–11
Хлорид цетилтриметиламмония	3–8
Катионный раствор Aquacat PF618	2–6
1,2-Пропандиол	2–5
SI-TEC AME 6057	1–3
Incroquat behenyl TM S	1–2
D-Пантенол	0,4–1,2
Феноксиэтанол	0,4–1,2
Глицерилстеарат	0,4–1,2
Muscoplex	0,4–1,2
Церафил 60	0,3–0,8

Collasurge - LQ- (WD)	0,3–0,8
Сафлоровое масло	0,2–0,5
Amipearl intense silver 1161	0,1–0,3
Токоферилацетат	0,1–0,3
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,1–0,3
Uvinul A plus B	0,1–0,2
Циклопентасилоксан	0,1–0,2
Декабен BL	0,1–0,2
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,1–0,2
Rewoteric AM 2C NM	0,1–0,2
Моногидрат лимонной кислоты	0,03–0,08
Бутилгидрокситолуол	0,03–0,08
Пантотенат кальция	0,01–0,03
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Биотин	0,001–0,02
SK-Influx V	0,001–0,003
Рутин	0,0006–0,0017
Сухой экстракт Galeopsis tetrahit	0,001–0,002
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
Сухой экстракт семян красного винограда	0,0005–0,0015
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0012
Масляный 20% р-р зеаксантина	0,0002–0,0006
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
N ¹ -Метилспермидин	0,0045–0,0135
Вода до 100 мл	

Пример 8

Укрепляющий гель	
Ингредиенты (INCI)	%, мас./мас.
Полимер Fixate PLUS	2–5
ПЭГ-40-Гидрогенизированное касторовое масло	1–3
Отдушка Apollon 436/F 0505436F	1–2
Сорбитол 70% некристаллизующийся	1–2
Гидроксиметилглицинат натрия	0,5–1,5
Гидроксипропилгуар	0,4–1,2
Бензофенон-4	0,15–0,45

Лувикват (поликватерниум 11)	0,15–0,45
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,05–0,15
Таурин	0,03–0,08
Пантотенат кальция	0,01–0,03
N ¹ -Метилспермидин	0,00275–0,00825
Сухой экстракт <i>Galeopsis tetrahit</i>	0,0003–0,0009
Биотин	0,00075–0,0025
Meditapox H-10	0,0001–0,0002
Вода до 100 мл	

Пример 9

Крем	
Ингредиенты	%, мас./мас.
Октилдодеканол	11,5–15,5
Цетилстеариловый спирт	8,5–11,5
Воск цетиловых эфиров	2,6–3,5
Моностеарат сорбитана	1,7–2,3
Полисорбат 60	1,3–1,7
Бензиловый спирт	0,9–1,2
N ¹ -Метилспермидин	0,0428–0,058
Биотин	0,0119–0,0161
Вода до 100 мл	

Пример 10

Таблетки	
Ингредиенты	Количество (мг)
Метионин	200–400
Витамин С с покрытием	50–150
Микрокристаллическая целлюлоза	40–160
Сухой экстракт семян красного винограда	30–90
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Зеаксантин 5%	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50
Селеновые дрожжи 2000 ч/млн	20–40
Бисглицинат цинка 28,2%	10–40
Коллоидный диоксид кремния	10–20
Сухой экстракт листьев оливы европейской	5–15

Пантотенат кальция	5–11
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,1–20
Бисглицинат меди 30%	2–6
Рутин	1–4
Витамин В6	1–4
Гиалуроновая кислота	1–2
Тригидрохлорид спермидина	0,3–0,8
Фолиевая кислота	0,1–0,3
Биотин	0,03–0,08

Пример 11

Таблетки

Ингредиенты	Количество (мг)
Микрокристаллическая целлюлоза	40–160
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50
Бисглицинат цинка 28,2%	10–40
Коллоидный диоксид кремния	10–20
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Бисглицинат меди 30%	2–6
Витамин В6	1–4
Гиалуроновая кислота	1–2
Тригидрохлорид спермидина	0,3–0,8
Биотин	0,03–0,08

Пример 12

Таблетки

Ингредиенты	Количество (мг)
Микрокристаллическая целлюлоза	40–160
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50
Бисглицинат цинка 28,2%	10–40

Коллоидный диоксид кремния	10–20
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	5–20
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Бисглицинат меди 30%	2–6
Витамин В6	1–4

Пример 13

Материалы и методы

Анализ методом иммуноблоттинга

Клетки U2OS выращивают до 80% слияния в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/ID-глюкозы), содержащей 4 мМ L-глутамин, 10% сыворотки плода коровы (FBS), и обрабатывают спермидином (партия 2010112716), *Galeopsis segetum* (IDN 6781), биотином (партия 2014124160) или их комбинациями. Образцы белка экстрагируют в буфере RIPA, как описано ранее (De Mei C., Ercolani L., Parodi C., Veronesi M., Vecchio CL., Bottegoni G. et al., Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene*. 2015; 34(20): 2597-608). Уровни p62/SQSTM1 и GAPDH анализируют со специфическими антителами анти-p62/SQSTM1 и анти-GADPH. Иммуноблотт-эксперименты выполняют в буфере TBS-T, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Антитела анти-LC3B и анти-GAPDH разводят 1:1000 и 1:50000, соответственно. Соответственно, HRP-конъюгированные вторичные антитела разводят 1:10000. После взаимодействия с ECL – реагентом для детекции для вестерн-блоттинга, обнаруживают хемилюминисцентные сигналы с помощью люминисцентного анализатора изображений LAS-4000, и вычисляют оптическую плотность полосы конкретного сигнала с помощью программы анализа изображений Photoshop. GAPDH принимают за контроль нагрузки, и сигналы GAPDH используют для нормализации уровней белка p62 в различных образцах.

Иммуноблоттинг повторяют по меньшей мере 4 раза для того, чтобы выразить величину как среднее \pm ср.-кв. ошибка (SEM).

Флуоресцентный анализ ингибирования аутофагии

Клетки U2OS высевают по 3000 клетки/лунка в 48-луночные планшеты № 1.5 Uncoated Coverslip, диаметр лунки 6 мм, предварительно сенсibilизированные раствором желатина, и трансдуцируют 0,2 мкл (di) бакуловирусом/10 000 клеток, содержащим

химерный белок p62-красный флуоресцентный белок (p62-RFP). Через 48 час после трансдукции клетки обрабатывают спермидином, биотином, Galeopsis или средой и контролируют 24 часа с использованием микроскопии для визуализации клеток NIKON Live Cell Imaging microscopy.

Синергетическая активность спермидина, *G. segetum* и биотина для индукции аутофагии в человеческих клетках

Для того, чтобы оценить может ли биотин и/или экстракт *Galeopsis segetum* воздействовать на аутофагию, авторы изобретения проверяют накопление аутофагосом в культивированных клетках U2OS с помощью флуоресцентной микроскопии живых клеток (Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016; 12(1): 1-222). В соответствии с этим, клетки трансдуцируют конструкцией, содержащей белок аутофагии LC3, слитый с красным флуоресцентным белком (RFP). Затем после добавления биотина (200 нг/мл) или сухого экстракта *Galeopsis* (100 нг/мл) контролируют накопление флуоресцентных точек LC3 путем получения изображений каждые 30 мин в течение 6 час. Спермидин (10 мкМ) принимают за положительный контроль соединения-индуктора аутофагии (Pietrocola F., Lachkar S., Enot D., Niso-Santano M., Bravo-San Pedro J., Sica V. et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death & Differentiation*, 2015; 22(3): 509-16).

Анализ показывает заметное накопление флуоресцентных точек LC3 в клетках, обработанных как биотином, так и *Galeopsis* (см. характерные изображения на фигуре 1). Как видно из фигуры 1, обработка спермидином приводит к заметному накоплению флуоресцентных точек (т.е., накоплению аутофагосом). Как биотин, так и сухой экстракт вызывают схожее накопление точек LC3-красный белок.

Поскольку точки LC3-RFP также могут накапливаться после блокады аутофагического потока, в силу этого также контролируют зависимую от аутофагии деградацию белка SQSTM1/p62 (Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016; 12(1): 1-222). В качестве связующего звена между LC3 и убиквитинированными субстратами служит p62 (Pankiv S., Clausen TH., Lamark T., Brech A., Bruun J-A., Outzen H. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(33): 24131-45). Белок p62 и связанные с p62 полиубиквитинированные белки оказываются включенными в завершённую аутофагосому и разрушаются в аутолизосомах, служа таким образом в качестве показателя аутофагической деградации

(Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016; 12(1): 1-222).

Соответственно, действие биотина и Galeopsis на опосредуемую аутофагией деградацию p62 оценивают, анализируя число p62-RFP аутофагосом флуоресцентной микроскопией живых клеток. В связи с этим клетки трансдуцируют конструкцией, экспрессирующей белок p62, слитый с RFP. Затем после добавления биотина, Galeopsis, спермидина или среды контролируют флуоресцентные точки p62.

Как полное подтверждение того, что как биотин, так и Galeopsis действуют как индукторы аутофагии, наблюдают резкое снижение точек p62-RFP в обработанных клетках по сравнению со средой (см. изображения, представленные на фигуре 2).

Как видно на фигуре 2, обработка ранее охарактеризованным индуктором аутофагии спермидином заметно снижает флуоресцентные точки p62 и флуоресцентные сигналы, показывая таким образом, что как биотин, так и экстракт *Galeopsis segetum* действуют как индукторы аутофагии, так как такие обработки вызывают резкое снижение флуоресцентных сигналов p62.

Как только подтверждена активность индуцирования аутофагии биотина и Galeopsis и подтверждается применение p62 в качестве подходящего маркера процесса аутофагии, оценивают действие комбинаций соединений на уровне белка p62 с помощью анализа методом иммуноблоттинга (De Mei C., Ercolani L., Parodi C., Veronesi M., Vecchio CL., Bottegoni G. et al. Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene*, 2015; 34(20): 2597-608).

Такой анализ показывает значительное синергетическое действие спермидина, биотина и Galeopsis при индукции опосредуемой аутофагией деградации p62 (таблица 1).

Таблица 1

Обработка	Процент снижения p62 против среды (% \pm SEM)	Ожидаемое снижение p62 от действия добавок	Синергетическое действие
Спермидин	5 \pm 0,11		
Биотин	21 \pm 1,5		
Galeopsis	24 \pm 2,1		
Спермидин + биотин	45 \pm 2,5	26 \pm 1,61	ДА
Спермидин + Galeopsis	51 \pm 3,3	29 \pm 2,21	ДА
Биотин + Galeopsis	67 \pm 5,5	45 \pm 3,6	ДА
Спермидин +	78 \pm 3,9	50 \pm 3,71	ДА

Обработка	Процент снижения p62 против среды (% \pm SEM)	Ожидаемое снижение p62 от действия добавок	Синергетическое действие
Galeopsis + биотин			

Действительно, комбинация спермидина (0,5 мкМ) и биотина (19,91 нг/мл) приводит к снижению p62 почти в два раза большему, чем снижение, ожидаемое за счет аддитивного действия (45% против 26%). Схожие результаты получают для комбинации спермидина и Galeopsis (7,9 нг/мл) (51% против 29%) и смеси биотин/Galeopsis (67% против 45%). Наконец, комбинация всех трех соединений (0,5 мкМ спермидина + 7,9 нг/мл Galeopsis + 19,91 нг/мл биотина) дает замечательное 78% снижение уровней белка p62.

Пример 14

Оценивают уровни липидированного LC3 и SQSTM1 в человеческих клетках U2OS, обработанных эквимоллярными дозами N¹-метилспермидина и спермидина. В результате по сравнению со средой оба соединения повышают уровни липидированной формы LC3-II и опосредованной стимулированной аутофагией деградации SQSTM1. Конкретно, культивируемые человеческие клетки U2OS обрабатывают 6 час средой или эквимоллярными дозами спермидина и N¹-метилспермидина (100 мкМ). Затем уровни липидированного LC3 (LC3-II) и SQSTM1 оценивают анализом методом иммуноблоттинга как в примере 8 со специфическим антителом. Сигналы актина принимают за контроль нагрузки. Денситометрический анализ сигналов белков приводится в виде относительных уровней белков, нормализованных по актину. Величина для образца среды установлена как 1. Величины показаны как среднее \pm SEM, n=3. *P<0,05 и **P<0,01, соединения против среды. Результаты приводятся на фигуре 3 (E и F). Эти результаты подтверждают, что N¹-метилспермидин сохраняет активность индукции аутофагии как и его деметилированный аналог.

ИЗМЕНЕННОЕ ПО СТ. 34 РСТ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННОЕ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

2010175

СИНЕРГЕТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ
В КАЧЕСТВЕ ПРОМОТОРА АУТОФАГИИ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к синергетическим композициям и их применению в качестве промотора аутофагии в пищевой, медицинской или косметической областях техники.

Уровень техники

Аутофагия (или аутофагоцитоз) является естественным регулируемым механизмом клетки, который разбирает ненужные или дисфункциональные компоненты. Аутофагия допускает организованную деградацию и рециклинг клеточных компонентов. При макроаутофагии таргетированные циклоплазматические составляющие выделяются из остатка клетки в двухмембранной везикуле, известной как аутофагосома. Аутофагосома в конечном счете сливается с лизосомами, и содержимое разрушается и возвращается в оборот. Обычно описываются три формы аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (СМА), наряду с миофагией. При заболевании аутофагия рассматривается как адаптивный ответ на стресс, который способствует выживанию, в то время как в других случаях оказывается, что он способствует гибели и заболеваемости клеток. В крайнем случае голодания разрушение клеточных компонентов способствует выживанию клеток, поддерживая клеточный энергетический уровень.

Следовательно, аутофагия играет ключевую роль в таких основных клеточных процессах, регулирующих здоровье, заболевание и старение, как адаптивные ответы на стресс, дифференцировка, развитие тканей и гомеостаз.

В работе Angeleen Fleming et al. “Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics”, *Nature Chemical Biology*, 7, 9–17 (2011), авторы показали, что аутофагия имеет неожиданные плеiotропные функции, которые благоприятствуют выживанию клеток, включая снабжение питательными веществами при голодании, очистку внутренней части клетки, защиту от инфекции и представление антигенов. Поэтому недостаточная аутофагия ассоциируется с рядом различных болезненных состояний, включая нейродегенерацию, рак и болезнь Крона.

В работе Teng Yu et al. “Targeting autophagy in skin diseases, *J. Mol. Med.* (2015), 93: 31-38” исследуются и описываются механизмы аутофагии в патогенезе кожных заболеваний. Конкретно сообщается о роли аутофагии при аутоиммунных кожных

воспалениях, таких как псориаз, системная красная волчанка (SLE) и витилиго, инфекционных кожных воспалений, раковых кожных заболеваний, таких как сквамозная клеточная карцинома и меланома.

Для того чтобы терапевтически модулировать аутофагию для исследования супрессоров и индукторов аутофагии, исследуют модели человеческих органов.

В работе Tobias Eiserberg et al. “Induction of autophagy by spermidine promotes longevity”, *Nature cell biology*, volume 11, number 11, November 2009, исследуют действие природного полиамина спермидина на дрожжах, мухах и червях. Авторы сообщают, что введение спермидина продлевает их жизнь. Кроме того, введение спермидина возможно ингибирует окислительный стресс у стареющих мышей. Показано, что аутофагия составляет основной путь лизосомной деградации для рециклинга поврежденного и потенциально вредного клеточного материала.

Авторы изобретения поняли, что в качестве полных циклически ремоделированных (мини)органов фолликулы волос скальпа человека (HF) могут предоставить такую модель, так как такие фолликулы после активности массового роста (анагена) спонтанно вступают в инволюцию органа, управляемую апоптозом (катаген). Как известно, жизненный цикл волосяной луковицы или фолликула по существу представлен тремя последовательными фазами: анагеном (рост), катагеном (инволюция) и телогеном (фаза покоя).

Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что жизненный цикл волосяного фолликула можно модулировать механизмом аутофагии, и на основе модели фолликулы волоса скальпа человека исследовали способствующие агенты.

В связи с исследованием, авторы изобретения выдвинули гипотезу, что HF скальпа в поздней стадии анагена, эпителий матрикса волос которых пролиферирует с более высокой скоростью, чем большинство злокачественных опухолей, и подвергается воздействию ряда стрессоров, подвергаются возрастающему давлению для поддержания тканевого гомеостаза и могут требовать существенного потока аутофагии для их потока для поддержания их роста.

Как известно, различные стрессоры отрицательно влияют на жизненный цикл волосяного фолликула, определяя таким образом уменьшение числа волос и их истончение.

Поэтому целью настоящего изобретения является композиция, подходящая в качестве промотора аутофагии в клетках волосяных фолликулов скальпа человека.

Следовательно, другой целью является композиция для способствования росту волос и/или ингибирования или замедления потери волос скальпа человека.

Другой целью является композиция для лечения состояний, опосредуемых

аутофагией.

Сущность изобретения

Начав с исследования органной культуры волосяных фолликулов скальпа человека (HF), авторы изобретения нашли комбинацию соединений, вызывающих аутофагию в исследуемой модели и показывающую синергетический эффект при промотировании аутофагии, особенно в клетках скальпа человека в волосяных фолликулах.

После исследования композицией, имеющей синергетический эффект, неожиданно стал экстракт растения рода *Galeopsis* в комбинации с другим соединением, промотирующем аутофагию особенно в клетках скальпа человека, выбранным из R-N¹-спермидина или его соли, биотина и их смеси.

Следовательно, указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis* и R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород или метил.

С другой стороны, указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis* и биотин.

В другом альтернативном воплощении указанные выше цели достигнуты с помощью синергетической композиции, включающей экстракт растения рода *Galeopsis*, биотин и R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород.

Предпочтительно и неожиданно авторы изобретения обнаружили, что введение указанных выше композиций топическим или пероральным путем введения синергетически промотирует аутофагию в клетках, в особенности, волосяных фолликулах, у субъекта, страдающего от поредения волос, определяя таким образом прогрессирующую густоту волос в пострадавших участках скальпа.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение следовательно предоставляет применение указанных выше композиций для стимуляции физиологического роста волос. Согласно еще одному аспектом, настоящее изобретение следовательно предоставляет указанные выше композиции для применения при лечении или предупреждении потери волос или болезни волосистой части головы.

Описание фигур

Фигура 1 показывает характерные изображения клеток U2OS, трансдуцированных конструкцией, экспрессирующей аутофагический белок LC3, слитый с красным флуоресцентным белком (RFP), обработанных 6 часов указанными веществами. Ранее охарактеризованный индуктор аутофагии спермидин используют в качестве положительного эталона.

Фигура 2 показывает характерные изображения клеток U2OS, трансдуцированных

конструкцией, экспрессирующей белок SQSTM1/p62, слитый с красным флуоресцентным белком (RFP), обработанных 6 часов указанными веществами. Оборот SQSTM1/p62 зависит главным образом от опосредуемого аутофагией процесса деградации.

Фигура 3 показывает уровни липидированного LC3 и SQSTM1 в человеческих клетках U2OS, обработанных эквимоллярными дозами N1-метилспермидина и спермидина, как описано в примере 14.

Подробное описание изобретения

Следовательно, изобретение относится к синергетической композиции, определенной в п.1. В предпочтительном и преимущественном воплощении изобретение относится к синергетической композиции экстракта растения рода *Galeopsis*, R-N¹-спермидина или его соли, в которых R представляет собой водород или метил, и биотина.

Экстракт композиции указанных выше композиций имеет происхождение из растения, принадлежащего к роду *Galeopsis*.

В одном воплощении экстракт *Galeopsis* представляет собой сухой экстракт, в частности, вида *Galeopsis segetum*, обычно известного как пикульник пушистый (*Downy Hemp-nettle*), т.е. вида цветущего растения в семействе яснотковых *Lamiaceae*.

В другом воплощении экстракт *Galeopsis* представляет собой экстракт, в частности, вида пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit*).

Экстракт по изобретению получают путем экстрагирования из части растения, такой как корни, листья, плоды и цветы, предпочтительно воздушных частей растения. Согласно некоторым воплощениям, экстракт растения по изобретению получают путем экстрагирования из части растения или его ткани с использованием физиологически приемлемого растворителя в качестве экстрагирующей среды.

Термином «физиологически приемлемый растворитель» обозначают растворитель, который не вызывает значительных вредных реакций, когда вводится в организм человека или применяется к организму человека. Типично термином «растворитель» обозначают растворитель, используемый для экстрагирования биологически активных компонентов из части растения *Galeopsis*.

Подходящим растворителем для получения экстракта растения является физиологически приемлемая жидкость, в которой растворяются по меньшей мере некоторые из физиологически активных компонентов выбранного растения, и в которой они не претерпевают изменения, которое лишает их активности.

Предпочтительными морфологическими частями растения, используемыми для осуществления экстрагирования, является растущая система, которая включает стебли, листья, распускающиеся цветки и цветки.

Растворитель, используемый для осуществления экстрагирования, может представлять собой физиологически приемлемый растворитель. Подходящими растворителями могут быть неполярные растворители, такие как диэтиловый эфир, хлороформ, полярные апротонные растворители, такие как этилацетат, дихлорэтан, и полярные протонные растворители, такие как спирты C₁-C₆ и содержащие их водные растворы. Предпочтительно использование полярных протонных растворителей. Типичные полярные протонные растворители включают воду, этанол, пропанол, изопропиловый спирт и их смеси. Предпочтительными растворителями являются вода и этиловый спирт и их смеси.

В некоторых воплощениях после экстрагирования полярным протонным растворителем, предпочтительно этанолом, экстракт предпочтительно фильтруют, концентрируют и осветляют. Затем полученный экстракт предпочтительно очищают. Очистку предпочтительнее осуществляют путем элюирования растворителем из колонки. Растворителем может являться, например, вода или этанол. Затем очищенный экстракт предпочтительно концентрируют и сушат. Полученный таким образом сухой экстракт можно, необязательно, измельчить и, необязательно, добавить эксципиенты, и получить конечный сухой экстракт, который используют в композициях по изобретению. Необязательные эксципиенты, включаемые в сухой экстракт, предпочтительно выбирают из группы, включающей мальтодекстрин и коллоидный безводный силикагель.

Для того чтобы получить экстракт *Galeopsis tetrahit*, для выделения/экстрагирования одного или нескольких биологически активных компонентов из растительных тканей растения можно использовать методы экстракции в системе твердое тело – жидкость.

В некоторых воплощениях экстрагирование одного или нескольких биологически активных компонентов происходит путем вымачивания растительной части или матрикса *Galeopsis tetrahit* в подходящем растворителе, указанном выше.

Например, подходящий экстракт можно получить путем окунания или вымачивания некой доли воздушных частей *Galeopsis* в смеси этанол-вода в течение времени, подходящего для обогащения растворителя одним или несколькими биологически активными компонентами, содержащимися в этой доле растения. В таких условиях происходит экстрагирование биологически активных компонентов из растительных тканей выбранного растения, по существу, за счет диффузии и/или осмоса. Время вымачивания долей растения в растворителе изменяется, например, от 1 до 48 часов.

В соответствии с некоторыми воплощениями, сухой экстракт *Galeopsis* можно

получить с помощью следующих стадий:

- измельчение по меньшей одной части растения *Galeopsis*;
- экстрагирование растворителем, предпочтительно физиологически приемлемым растворителем;
- фильтрование экстракта;
- очистка фильтрованного экстракта, предпочтительно путем элюирования растворителем из колонки;
- сушка очищенного экстракта;
- измельчение высушенного очищенного экстракта.

В некоторых воплощениях стадию экстрагирования можно повторять два или три раза.

Когда растворитель удаляют, например, выпариванием, необязательно можно добавить твердый носитель или эксципиент, такой как, например, без ограничения, крахмалы или мальтодекстрины, и получить экстракт в форме сухого порошка.

Типично экстракт, полученный из *Galeopsis tetrahit* или *segetum*, может быть жидким, густым или сухим, и предпочтительно представляет собой сухое вещество.

Например:

- в жидком экстракте 1 мл экстракта содержит биологически активные компоненты, растворенные в 1 г растительного лекарственного средства;
- в густом экстракте растворитель частично выпарен, в частности, до тех пор, пока экстракт не увлажняет фильтровальную бумагу;
- в сухом экстракте растворитель выпарен почти полностью с образованием порошка.

Можно получить экстракты *Galeopsis* различной полярности.

Например, можно получить экстракт высокой полярности с использованием полярного растворителя, такого как водно-спиртовой раствор, экстракт промежуточной полярности с использованием менее полярного растворителя, такого как этилацетат, или неполярный экстракт с использованием сверхкритического CO₂, которым можно экстрагировать фракции активных фитокомплексов.

В некоторых воплощениях экстрагирование выполняют, используя массовое соотношение между растворителем и растительным матриксом, колеблющееся от 1:10 до 10:1.

Возможно экстрагировать биологически активные компоненты из растения *Galeopsis*, используя другие методы экстрагирования, такие как, например, путем гидролиза, инфузии, сжатия, отваривания, перколяции, противоточное экстрагирование,

экстрагирование в аппарате Сокслета, экстрагирование сверхкритическими газами или с помощью ультразвука.

Кроме экстракта растения синергетическая композиция может включать R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой водород или метил. Спермидин представляет собой полиамин, имеющий по номенклатуре ИЮПАК название N¹-(3-аминопропил)бутан-1,4-диамин. Спермидин может присутствовать в композиции в форме соли, предпочтительно фармацевтически приемлемой соли, предпочтительнее в форме тригидрохлорида.

Кроме экстракта растения синергетическая композиция может включать биотин – водорастворимый витамин В, также называемый витамином В7 и известный ранее как витамин Н или кофермент R.

Биотин состоит из цикла уреидо, слитого с тетрагидротиофеновым циклом, имея по номенклатуре ИЮПАК название 5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил]пентановая кислота (номер CAS 58-85-5).

Авторы изобретения впервые показали свойство биотина быть промотором аутофагии в клетках человека, конкретно, клетках волосяных фолликулов скальпа человека.

Поэтому изобретение также относится к биотину или композиции, содержащей биотин согласно любому из воплощений, описанных выше, для применения в косметической или пищевой отрасли или медицине в качестве промотора аутофагии при лечении заболеваний, модулируемых аутофагией.

Заболевания, модулируемые аутофагией, выбирают, например, из группы, включающей нейродегенерацию, рак, болезнь Крона и кожные заболевания. Конкретно из кожных заболеваний можно назвать аутоиммунные воспаления кожи, такие как псориаз, системная красная волчанка (SLE) и витилиго, инфекционные воспаления кожи, раковые воспаления кожи, такие как сквамозно-клеточная карцинома и меланома.

Впервые экстракт растения рода *Galeopsis*, предпочтительно вида *Galeopsis segetum* и *Galeopsis tetrahit*, использован как промотор аутофагии при лечении кожных заболеваний.

Предпочтительно, и неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что введение вышеуказанных композиций, типично топическим или пероральным путем введения, синергетически промотирует аутофагию в клетках волосяных фолликулов скальпа человека у субъекта, страдающего от истончения волос, определяя таким образом прогрессирующую густоту волос в пострадавших участках скальпа

Типично композиция по изобретению включает физиологически и/или

фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Физиологически или фармацевтически подходящий носитель, разбавитель или эксципиент можно выбрать, основываясь на пути введения, для которого предназначена получаемая фармацевтическая композиция. Любой носитель и/или эксципиент, подходящий для желательной формы препарата для введения, рассматривается в применениях экстракта растения или его активных ингредиентов, описанных в настоящем описании.

В рамках настоящего изобретения термин «носитель» относится к эксципиенту, среде, разбавителю или адьюванту, который может или не может присутствовать в композиции по изобретению.

Композицию по изобретению можно составить в форме для топического применения или в форме для перорального введения.

В некоторых воплощениях композиция является композицией для топического применения. При таком применении композицию по изобретению можно применить, в эффективном количестве, непосредственно к скальпу или коже человека.

Например, при лечении потери волос или форм истончения косметически/физиологически активное количество композиции можно наносить непосредственно на скальп один или несколько раз в день, обычно курсами, длящимися 2-3 месяца, чередующимися с периодами отсутствия лечения.

Согласно таким аспектам, изобретение также относится к косметическому методу лечения, включающему нанесение на скальп или его часть эффективного количества композиции согласно одному или нескольким воплощениям, описанным и/или заявленным в настоящей заявке.

Количество сухого экстракта *Galeopsis*, предпочтительно в форме вида *Galeopsis segetum* или *Galeopsis tetrahit*, в топическом препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,0003–0,01 мас.% относительно общей массы препарата.

Количество биотина в топическом препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,0006–0,075 мас.% относительно общей массы препарата.

В топической форме композиция предпочтительно включает N¹-метилспермидин. В топической форме N¹-метилспермидин или спермидин предпочтительно включен в интервале 0,0005-0,1 мас.% относительно общей массы препарата.

Из обычных эксципиентов в топическом препарате для косметического применения или для фармацевтического применения можно назвать консерванты, антибактериальные вещества, эмульгаторы, буферы, лубриканты, смачивающие вещества, кондиционеры и красители.

Композиция для топического применения может находиться в твердой, полутвердой или жидкой форме. Подходящие препараты в твердой форме включают кремы, гели, мази, пасты.

В других воплощениях препарат для местного введения находится в жидкой форме, например, в форме лосьонов, гелей, шампуней, суспензий, эмульсий.

В случае препаратов в жидкой или полутвердой форме экстракт растения может быть разбавлен в носителе в физиологически приемлемой жидкой форме, такой как вода, водно-спиртовой раствор или раствор глицерина, или смешан с другими жидкостями, подходящими для местного нанесения.

Как пример, композиции по изобретению в жидкой форме можно получить путем растворения компонентов в воде и/или спирте. Жидкую композицию можно забуферить для достижения интервала рН, обычно выбранного от 5 до 7 для совместимости с рН скальпа, и затем отфильтровать и упаковать в подходящие контейнеры, такие как пузырьки или флаконы.

В некоторых воплощениях композиции по изобретению могут включать эксципиенты, обычно используемые при составлении косметических или фармацевтических препаратов для местного применения, такие как консерванты, антибактериальные вещества, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, смачиватели, красители и другие эксципиенты, обычно используемые в методах получения.

В одном воплощении препарат для местного применения находится в форме эмульсии, содержащей экстракт в подходящем эксципиенте. В некоторых воплощениях композиция для топического применения включает эксципиент типа гидроксиметилцеллюлозы и/или загуститель с ГЛБ, подходящим для препарата и веществ.

Согласно другим воплощениям, композиция по изобретению находится в форме для перорального введения. В таких случаях композиция содержит компоненты, определенные ранее, и один или несколько носителей или эксципиентов, подходящих для перорального введения.

Количество экстракта *Galeopsis*, предпочтительно в форме вида *Galeopsis segetum* или *Galeopsis tetrahit*, в пероральном препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,1–20 мг на одну дозу.

Количество биотина в пероральном препарате композиций по изобретению находится в интервале 0,03–0,08 мг на одну дозу.

В пероральной форме композиция включает предпочтительно спермидин или его соль, предпочтительнее спермидин в форме соли.

В пероральной форме N¹-метилспермидин (или его соль) или спермидин (или его

соль) предпочтительно включен в интервале 0,3 – 0,8 мг на одну дозу.

Как пример, подходящие эксципиенты для перорального введения включают производные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, карбоксиэтилцеллюлоза, этилгидроксиэтилцеллюлоза, ацетобутират целлюлозы, ацетофталат целлюлозы и их смеси.

Другие примеры подходящих эксципиентов включают полимеры, принадлежащие к семейству лактамов, такие как пирролидон и его производные, например, поливинилпирролидон, поливинилполипропилпирролидон и их смеси, неорганические соли, такие как фосфат кальция или дикальцийфосфат, лубриканты, такие как стеарат магния, триацилглицерины и их смеси.

Композиции для перорального введения могут находиться в твердой или жидкой форме. Типичные композиции в твердой форме включают таблетки, капсулы, порошки, гранулы, пиллюли. Примеры композиций в жидкой форме включают растворы, эмульсии, суспензии, сиропы. Композиции также могут находиться в форме с регулируемым высвобождением содержащихся в них активных компонентов.

Таблетки обычно включают подходящий носитель или эксципиент, в котором распределен экстракт растения, типично в сухой форме.

Из типичных эксципиентов или носителей для перорального введения в состав композиции могут быть включены дезинтеграторы, наполнители, консерванты.

В некоторых воплощениях композиция по изобретению представляет собой пищевой продукт, диетический продукт или нутрицевтический продукт.

Термин «пищевая добавка» обозначает продукт, который улучшает питательный статус и может быть использован для поддержания или улучшения функциональной активности одного или нескольких органов или функциональности человеческого организма в физиологических границах. Композиции по изобретению, будучи промоторами аутофагии, являются поэтому способствующими росту волос нутрицевтиками и косметическими средствами.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению описанных выше синергетических композиций для стимуляции физиологического роста волос и/или для лечения от потери волос.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению топического или перорального препарата, включающего описанные выше композиции, для стимуляции физиологического роста волос.

Согласно еще одному аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к

описанным выше синергетическим композициям для применения в качестве промотора аутофагии в клетках волосяных фолликулов скальпа человека при лечении и предупреждении потери волос и для стимуляции роста волос.

Согласно другому специфическому аспекту, настоящее изобретение относится, следовательно, к применению топического или перорального препарата, включающего описанные выше композиции, для стимуляции роста волос или для лечения или предупреждения потери волос.

Связь между промотированием аутофагии и упомянутыми выше активностями композиций по изобретению доказывается испытаниями, описанными в приведенном далее примере 13. В частности, в научной статье Chiara Parodi et al.: “Autophagy is essential for maintaining the growth of a human (mini)organ: Evidence from scalp hair follicle organ culture”, опубликованной в PLOS Biology, vol. 16(3), 2018, 28. Mar: 10.1371/journal.pbio.2002864, показано, что испытание, выполненное на эпителиальных клетках остеосаркомы человека, является установленной моделью для доказательства эффективности композиции при стимуляции роста волос.

Эксперимент показывает синергизм при стимуляции аутофагии на проверенной модели *in vitro*. Результаты и публикация показывают, что аутофагия необходима для роста волосяного фолликула. Композиция по изобретению стимулирует аутофагию и, следовательно, является эффективной при стимуляции роста волос.

В некоторых аспектах изобретение относится к описанной выше композиции для применения при лечении расстройств роста волос, таких как в случае андрогенной алопеции или облысения.

В другом аспекте изобретение относится к применению описанных выше композиций в качестве промотора аутофагии при лечении воспаления кожи.

Авторы изобретения также обнаружили, что композиция, включающая N-метилспермидин и биотин, подходит в качестве промотора аутофагии при лечении кожных заболеваний.

Вводимые количества и частота введения композиции будут зависеть от типа и тяжести заболеваний, от которых лечат.

Теперь изобретение будет описано подробнее с обращением к конкретным воплощениям, показывающим синергетические результаты, достигаемые композициями по изобретению, но не должны рассматриваться как ограничивающие. Количества указанных компонентов выражаются в массовых (мас./мас.) процентах (%) или в мг на одну дозу для введения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЧАСТИ

Пример 1

Получение экстракта *Galeopsis segetum*

Получение сухого экстракта *Galeopsis segetum* выполняют путем экстрагирования 40% этанолом с последующей очисткой на колонке. Стадии описаны в последующих разделах.

Экстрагирование

Измельченные высушенные воздушные части *G. segetum* экстрагируют дважды при 50°C в течение 2 часов 40% этанолом. Твердое вещество и жидкость разделяют с помощью декантатора.

Жидкие экстракты фильтруют, концентрируют в вакууме и затем осветляют центрифугированием.

Очистка

Колонку заполняют ионообменной смолой-сорбентом XAD7HP, которую предварительно замачивают в 95% этаноле и выдерживают в течение 10 часов. Затем набитую колонку промывают водой, продолжая промывание до тех пор, пока проводимость элюата не достигнет такой же величины, как у загружаемой воды.

Очистку экстракта выполняют на колонке, набитой XAD7HP, с элюированием сначала водой и затем 70% этанолом.

Собранные элюаты концентрируют в вакууме.

К концентрированному раствору добавляют этанол, и затем раствор греют при 70-75°C в течение 30 минут для того, чтобы снизить уровень бионагрузки.

Раствор снова концентрируют в вакууме, сушат при 50°C в течение 24 часов, и затем остаток измельчают и смешивают с эксципиентами (смесью мальтодекстрина и коллоидного безводного силикагеля 90/10), и получают конечный продукт.

Пример 2

Получение экстракта *Galeopsis tetrahit*

Получение сухого экстракта *Galeopsis tetrahit* выполняют, точно следуя процедуре, описанной в предыдущих абзацах для экстрагирования *Galeopsis segetum*.

Пример 3

Оздоровливающий шампунь

Ингредиенты	%, масс./масс.
Zetesol MGS/B	16–49
Лауроилсаркозинат натрия	4–12
Mirasheen CP 820/G	2–6
Rewoderm LI S 80	1–4

Euxyl K 701	1–2
BC 2262	0,5–1,4
Кокамид МРА	0,5–1,4
Калий-ундециленоил-гидролизованный белок пшеницы	0,5–1,4
Моногидрат лимонной кислоты	0,4–1,2
Моногидрат бетаина	0,2–0,7
Хлорид лаурилметилглюцит-10-гидроксипропилдимония	0,2–0,7
Gafquat 755 N-O	0,2–0,5
D-Пантенол	0,1–0,3
Тринатрия этилендиамин дисукцинат	0,1–0,3
ВНА	0,01–0,02
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,003–0,009
Биотин	0,001–0,03
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
N ¹ -Метилспермидин	0,0005–0,1
Лецитин	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
Вода до 100 мл	
Пример 4	
Укрепляющий шампунь	
Ингредиенты	%, масс./масс.
Zetesol MGS/B	15–60
N-Лауроилсаркозинат натрия	4–12
Mirasheen CP 820/G	2-6
Rewoderm LI S 80	1-4
Euxyl K 701	1-2
Кокамид МРА	0,5–1,4
Калий-ундециленоил-гидролизованный белок пшеницы	0,5–1,4
Моногидрат лимонной кислоты	0,4–1,1
BC 2262	0,3–0,8
Моногидрат бетаина	0,2–0,7
Хлорид лаурилметилглюцит-10-гидроксипропилдимония	0,2–0,7
Abil Soft AF 100	0,2–0,6
Gafquat 755 N-O	0,2–0,5

D-Пантенол	0,1–0,3
Тринатрия этилендиамин дисукцинат	0,1–0,3
ВНА	0,01–0,02
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,003–0,009
Биотин	0,001–0,003
Meditanox H-10	0,001–0,002
N ¹ -Метилспермидин	0,001–0,002
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
Вода до 100 мл	

Пример 5

Лосьон	
Ингредиенты	%, мас./мас.
Этанол	9–27
Пантотенат кальция	1–2
ПЭГ-40-Гидрогенизированное касторовое масло	1–2
Молочная кислота, 80% p-p	0,1–0,4
Lurabelle soyaglycone	0,04–0,13
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,03–0,1
N ¹ -Метилспермидин	0,03–0,09
Лецитин NAT 8539	0,02–0,07
Октадецил-ди-трет-бутил-4-гидроксигидроциннамат	0,02–0,07
Fomblin HC/PU-CAT5	0,009–0,027
Биотин	0,007–0,022
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
Вода до 100 мл	

Пример 6

Укрепляющий кондиционер	
Ингредиенты	%, мас./мас.
Хлорид цетилтриметиламмония	3–9
Цетилстеариловый спирт	3–8
Silsoft 8812	2–7
Арлацел 165-PA-(MV)	2–5
Глицерилстеарат	2–5

Алкиллактат C12-13	1–3
Dow Corning CE 8401	1–2
Ксилит	1–2
Bioscontrol synergy BAS	0,3–0,9
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,3–0,9
D-Пантенол	0,3–0,8
Униглюкан G-51	0,3–0,8
Жидкая молочная кислота	0,1–0,4
Фитантриол	0,1–0,3
Бензоат натрия	0,1–0,3
Дегидроацетат натрия	0,1–0,3
Циклопентасилоксан	0,1–0,2
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,1–0,2
Серицин	0,1–0,2
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0–0,01
Биотин	0,01–0,03
Meditanox H-10	0,001–0,002
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
N ¹ -Метилспермидин	0,025–0,075
Вода до 100 мл	

Пример 7

Укрепляющий кондиционер

Ингредиенты	%, мас./мас.
Цетостеариловый спирт	4–11
Хлорид цетилтриметиламмония	3–8
Катионный раствор Aquacat PF618	2–6
1,2-Пропандиол	2–5
SI-TEC AME 6057	1–3
Incroquat behenyl TM S	1–2
D-Пантенол	0,4–1,2
Феноксизтанол	0,4–1,2
Глицерилстеарат	0,4–1,2
Mucomplex	0,4–1,2

Церафил 60	0,3–0,8
Collasurge - LQ- (WD)	0,3–0,8
Сафлоровое масло	0,2–0,5
Amipearl intense silver 1161	0,1–0,3
Токоферилацетат	0,1–0,3
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,1–0,3
Uvinul A plus B	0,1–0,2
Циклопентасилоксан	0,1–0,2
Декабен BL	0,1–0,2
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,1–0,2
Rewoteric AM 2C NM	0,1–0,2
Моногидрат лимонной кислоты	0,03–0,08
Бутилгидрокситолуол	0,03–0,08
Пантотенат кальция	0,01–0,03
Гидроксипропилтримониум гиалуронат	0,01–0,02
Биотин	0,001–0,02
SK-Influx V	0,001–0,003
Рутин	0,0006–0,0017
Сухой экстракт Galeopsis tetrahit	0,001–0,002
Meditanox H-10	0,0005–0,0015
Сухой экстракт семян красного винограда	0,0005–0,0015
Лецитин NAT 8539	0,0004–0,0012
Масляный 20% р-р зеаксантина	0,0002–0,0006
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002–0,0005
N ¹ -Метилспермидин	0,0045–0,0135
Вода до 100 мл	
Пример 8	
Укрепляющий гель	
Ингредиенты (INCI)	%, мас./мас.
Полимер Fixate PLUS	2–5
ПЭГ-40-Гидрогенизированное касторовое масло	1–3
Отдушка Apollon 436/F 0505436F	1–2
Сорбитол 70% некристаллизующийся	1–2
Гидроксиметилглицинат натрия	0,5–1,5
Гидроксипропилгуар	0,4–1,2

Бензофенон-4	0,15–0,45
Лувикват (поликватерниум 11)	0,15–0,45
Дигидрат динатриевой соли ЭДТК	0,05–0,15
Таурин	0,03–0,08
Пантотенат кальция	0,01–0,03
N ¹ -Метилспермидин	0,00275–0,00825
Сухой экстракт <i>Galeopsis tetrahit</i>	0,0003–0,0009
Биотин	0,00075–0,0025
Meditanox H-10	0,0001–0,0002

Пример 9

Крем	
Ингредиенты	%, мас./мас.
Октилдодеканол	11,5–15,5
Цетилстеариловый спирт	8,5–11,5
Воск цетиловых эфиров	2,6–3,5
Моностеарат сорбитана	1,7–2,3
Полисорбат 60	1,3–1,7
Бензиловый спирт	0,9–1,2
N ¹ -Метилспермидин	0,0428–0,058
Биотин	0,0119–0,0161
Вода до 100 мл	

Пример 10

Таблетки	
Ингредиенты	Количество (мг)
Метионин	200–400
Витамин С с покрытием	50–150
Микрокристаллическая целлюлоза	40–160
Сухой экстракт семян красного винограда	30–90
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Зеаксантин 5%	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50
Селеновые дрожжи 2000 ч/млн	20–40
Бисглицинат цинка 28,2%	10–40
Коллоидный диоксид кремния	10–20

Сухой экстракт листьев оливы европейской	5–15
Пантотенат кальция	5–11
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	0,1–20
Бисглицинат меди 30%	2–6
Рутин	1–4
Витамин В6	1–4
Гиалуроновая кислота	1–2
Тригидрохлорид спермидина	0,3–0,8
Фолиевая кислота	0,1–0,3
Биотин	0,03–0,08

Пример 11

Таблетки

Ингредиенты	Количество (мг)
Микrokристаллическая целлюлоза	40–160
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50
Бисглицинат цинка 28,2%	10–40
Коллоидный диоксид кремния	10–20
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Бисглицинат меди 30%	2–6
Витамин В6	1–4
Гиалуроновая кислота	1–2
Тригидрохлорид спермидина	0,3–0,8
Биотин	0,03–0,08

Пример 12

Таблетки

Ингредиенты	Количество (мг)
Микrokристаллическая целлюлоза	40–160
Гидроксипропилметилцеллюлоза К100	20–70
Витамин Е (ацетат токоферола) 50%	20–50

Бисглицинат цинка 28,2%	10–40
Коллоидный диоксид кремния	10–20
Сухой экстракт <i>Galeopsis segetum</i>	5–20
Полиэтиленгликоль 6000	4–12
Стеарат магния	4–12
Поливинилпирролидон К30	3–10
Бисглицинат меди 30%	2–6
Витамин В6	1–4

Пример 13

Материалы и методы

Анализ методом иммуноблоттинга

Клетки U2OS выращивают до 80% слияния в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/лD-глюкозы), содержащей 4 mM L-глутамин, 10% сыворотки плода коровы (FBS), и обрабатывают спермидином (партия 2010112716), *Galeopsis segetum* (IDN 6781), биотином (партия 2014124160) или их комбинациями. Образцы белка экстрагируют в буфере RIPA, как описано ранее (De Mei C., Ercolani L., Parodi C., Veronesi M., Vecchio CL., Bottegoni G. et al., Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene*. 2015; 34(20): 2597-608). Уровни p62/SQSTM1 и GAPDH анализируют со специфическими антителами анти-p62/SQSTM1 и анти-GADPH. Иммуноблотт-эксперименты выполняют в буфере TBS-T, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Антитела анти-LC3B и анти-GAPDH разводят 1:1000 и 1:50000, соответственно. Соответственно, HRP-конъюгированные вторичные антитела разводят 1:10000. После взаимодействия с ECL – реагентом для детекции для вестерн-блоттинга, обнаруживают хемилюминисцентные сигналы с помощью люминисцентного анализатора изображений LAS-4000, и вычисляют оптическую плотность полосы конкретного сигнала с помощью программы анализа изображений Photoshop. GAPDH принимают за контроль нагрузки, и сигналы GAPDH используют для нормализации уровней белка p62 в различных образцах.

Иммуноблоттинг повторяют по меньшей мере 4 раза для того, чтобы выразить величину как среднее \pm ср.-кв. ошибка (SEM).

Флуоресцентный анализ ингибирования аутофагии

Клетки U2OS высевают по 3000 клетки/лунка в 48-луночные планшеты № 1.5 Uncoated Coverslip, диаметр лунки 6 мм, предварительно сенсibilизированные раствором

желатина, и трансдуцируют 0,2 мкл (di) бакуловирусом/10 000 клеток, содержащим химерный белок p62-красный флуоресцентный белок (p62-RFP). Через 48 час после трансдукции клетки обрабатывают спермидином, биотином, Galeopsis или средой и контролируют 24 часа с использованием микроскопии для визуализации клеток NIKON Live Cell Imaging microscopy.

Синергетическая активность спермидина, *G. segetum* и биотина для индукции аутофагии в человеческих клетках

Для того, чтобы оценить может ли биотин и/или экстракт *Galeopsis segetum* воздействовать на аутофагию, авторы изобретения проверяют накопление аутофагосом в культивированных клетках U2OS с помощью флуоресцентной микроскопии живых клеток (Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2016; 12(1): 1-222). В соответствии с этим, клетки трансдуцируют конструкцией, содержащей белок аутофагии LC3, слитый с красным флуоресцентным белком (RFP). Затем после добавления биотина (200 нг/мл) или сухого экстракта *Galeopsis* (100 нг/мл) контролируют накопление флуоресцентных точек LC3 путем получения изображений каждые 30 мин в течение 6 час. Спермидин (10 мкМ) принимают за положительный контроль соединения-индуктора аутофагии (Pietrocola F., Lachkar S., Enot D., Niso-Santano M., Bravo-San Pedro J., Sica V. et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death & Differentiation*, 2015; 22(3): 509-16).

Анализ показывает заметное накопление флуоресцентных точек LC3 в клетках, обработанных как биотином, так и *Galeopsis* (см. характерные изображения на фигуре 1). Как видно из фигуры 1, обработка спермидином приводит к заметному накоплению флуоресцентных точек (т.е., накоплению аутофагосом). Как биотин, так и сухой экстракт вызывают схожее накопление точек LC3-красный белок.

Поскольку точки LC3-RFP также могут накапливаться после блокады аутофагического потока, в силу этого также контролируют зависимую от аутофагии деградацию белка SQSTM1/p62 (Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016; 12(1): 1-222). В качестве связующего звена между LC3 и убиквитинированными субстратами служит p62 (Pankiv S., Clausen TH., Lamark T., Brech A., Bruun J-A., Outzen H. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(33): 24131-45). Белок p62 и связанные с p62 полиубиквитинированные белки оказываются включенными в завершённую аутофагосому и разрушаются в

аутолизосомах, служа таким образом в качестве показателя аутофагической деградации (Klionsky DJ., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin MJ., Abeliovich H., Acevedo Arozena A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016; 12(1): 1-222).

Соответственно, действие биотина и Galeopsis на опосредуемую аутофагией деградацию p62 оценивают, анализируя число p62-RFP аутофагосом флуоресцентной микроскопией живых клеток. В связи с этим клетки трансдуцируют конструкцией, экспрессирующей белок p62, слитый с RFP. Затем после добавления биотина, Galeopsis, спермидина или среды контролируют флуоресцентные точки p62.

Как полное подтверждение того, что как биотин, так и Galeopsis действуют как индукторы аутофагии, наблюдают резкое снижение точек p62-RFP в обработанных клетках по сравнению со средой (см. изображения, представленные на фигуре 2).

Как видно на фигуре 2, обработка ранее охарактеризованным индуктором аутофагии спермидином заметно снижает флуоресцентные точки p62 и флуоресцентные сигналы, показывая таким образом, что как биотин, так и экстракт Galeopsis segetum действуют как индукторы аутофагии, так как такие обработки вызывают резкое снижение флуоресцентных сигналов p62.

Как только подтверждена активность индуцирования аутофагии биотина и Galeopsis и подтверждается применение p62 в качестве подходящего маркера процесса аутофагии, оценивают действие комбинаций соединений на уровне белка p62 с помощью анализа методом иммуноблоттинга (De Mei C., Ercolani L., Parodi C., Veronesi M., Vecchio CL., Bottegoni G. et al. Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene*, 2015; 34(20): 2597-608).

Такой анализ показывает значительное синергетическое действие спермидина, биотина и Galeopsis при индукции опосредуемой аутофагией деградации p62 (таблица 1).

Таблица 1

Обработка	Процент снижения p62 против среды (% \pm SEM)	Ожидаемое снижение p62 от действия добавок	Синергетическое действие
Спермидин	5 \pm 0,11		
Биотин	21 \pm 1,5		
Galeopsis	24 \pm 2,1		
Спермидин + биотин	45 \pm 2,5	26 \pm 1,61	ДА
Спермидин + Galeopsis	51 \pm 3,3	29 \pm 2,21	ДА
Биотин + Galeopsis	67 \pm 5,5	45 \pm 3,6	ДА

Обработка	Процент снижения р62 против среды (% ± SEM)	Ожидаемое снижение р62 от действия добавок	Синергетическое действие
Спермидин + Galeopsis + биотин	78 ± 3,9	50 ± 3,71	ДА

Действительно, комбинация спермидина (0,5 мкМ) и биотина (19,91 нг/мл) приводит к снижению р62 почти в два раза большему, чем снижение, ожидаемое за счет аддитивного действия (45% против 26%). Схожие результаты получают для комбинации спермидина и Galeopsis (7,9 нг/мл) (51% против 29%) и смеси биотин/Galeopsis (67% против 45%). Наконец, комбинация всех трех соединений (0,5 мкМ спермидина + 7,9 нг/мл Galeopsis + 19,91 нг/мл биотина) дает замечательное 78% снижение уровней белка р62.

Пример 14

Оценивают уровни липидированного LC3 и SQSTM1 в человеческих клетках U2OS, обработанных эквимольными дозами N¹-метилспермидина и спермидина. В результате по сравнению со средой оба соединения повышают уровни липидированной формы LC3-II и опосредованной стимулированной аутофагией деградации SQSTM1. Конкретно, культивированные человеческие клетки U2OS обрабатывают 6 час средой или эквимольными дозами спермидина и N¹-метилспермидина (100 мкМ). Затем уровни липидированного LC3 (LC3-II) и SQSTM1 оценивают анализом методом иммуноблоттинга как в примере 8 со специфическим антителом. Сигналы актина принимают за контроль нагрузки. Денситометрический анализ сигналов белков приводится в виде относительных уровней белков, нормализованных по актину. Величина для образца среды установлена как 1. Величины показаны как среднее ± SEM, n=3. *P<0,05 и **P<0,01, соединения против среды. Результаты приводятся на фигуре 3 (А и В). Эти результаты подтверждают, что N¹-метилспермидин сохраняет активность индукции аутофагии как и его деметилированный аналог.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Синергетическая композиция, включающая экстракт растения рода *Galeopsis* и соединение, промотирующее аутофагию, выбранное из R-N¹-спермидина или его соли, в которых R представляет собой водород или метил, биотина и их смесей.

2. Синергетическая композиция по п.1, где экстракт растения рода *Galeopsis* выбирают из экстрактов вида *Galeopsis segetum* и *Galeopsis tetrahit* и их смесей.

3. Синергетическая композиция по п.2, где экстракт растения рода *Galeopsis* представляет собой сухой экстракт, который можно получить способом, включающим следующие стадии:

- измельчение по меньшей одной части растения рода *Galeopsis*;
- экстрагирование растворителем, предпочтительно физиологически приемлемым растворителем;
- фильтрование экстракта;
- очистка фильтрованного экстракта, предпочтительно путем элюирования растворителем из колонки;
- сушка очищенного экстракта;
- измельчение высушенного очищенного экстракта и,
- необязательно, добавление эксципиентов.

4. Синергетическая композиция по п.3, где эксципиенты включают мальтодекстрин и/или коллоидный безводный силикагель.

5. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-4, где спермидин присутствует в композиции в форме тригидрохлорида.

6. Топический препарат, включающий синергетическую композицию по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один эксципиент, подходящий для топического введения.

7. Топическая композиция по п.6, где количество экстракта растения рода *Galeopsis* находится в интервале 0,0003–0,01 мас.% относительно общей массы композиции.

8. Топический препарат по п. 6 или п.7, где количество биотина находится в интервале 0,0006–0,075 мас.% относительно общей массы композиции.

9. Топический препарат по любому из пп. 6-8, где композиция включает R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой метил или водород, в интервале 0,0005-0,1 мас.% относительно общей массы композиции.

10. Топический препарат по любому из пп. 6-9, где препарат находится в форме, выбранной из группы, включающей шампунь, гель, кондиционер, лосьон, бальзам, эмульсию, пенку, средство макияжа и крем.

11. Пероральный препарат, включающий синергетическую композицию по любому

из пп. 1-5 и по меньшей мере один эксципиент, подходящий для перорального введения.

12. Пероральный препарат по п.11, где количество сухого экстракта растения рода *Galeopsis* в пероральном препарате находится в интервале 0,1–20 мг на одну дозу.

13. Пероральный препарат по п. 11 или 12, где количество биотина в пероральном препарате находится в интервале 0,03г – 0,08 мг на одну дозу.

14. Пероральный препарат по п. 11 или 12, где композиция включает R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой метил или водород, в интервале 0,3–,8 мг на одну дозу.

15. Пероральный препарат по любому из пп. 11-14, где препарат представляет собой твердый препарат, выбранный из группы, включающей таблетку, капсулу, порошок, гранулы или пилюлю.

16. Применение синергетической композиции по любому из пп. 1-5 или топического препарата по любому из пп. 6-10 или перорального препарата по любому из пп. 11-15 при промотировании роста волос и/или лечении истончения волос или потери волос.

17. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-5 или топический препарат по любому из пп. 6-10 или пероральный препарат по любому из пп. 11-15 для применения в качестве промотора аутофагии в клетках волосяных фолликулов скальпа человека при промотировании роста волос и/или лечении истончения волос или потери волос.

18. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-5 для применения в качестве промотора аутофагии при лечении заболевания, модулируемого аутофагией.

19. Синергетическая композиция для применения по п.18, где заболевания, модулируемые аутофагией, выбирают из группы, включающей нейродегенерацию, рак, болезнь Крона и кожные заболевания.

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Синергетическая композиция, включающая экстракт растения рода *Galeopsis* и соединение, промотирующее аутофагию, выбранное из R-N¹-спермидина или его соли, в которых R представляет собой водород или метил, биотина и их смесей.

2. Синергетическая композиция по п.1, где экстракт растения рода *Galeopsis* выбирают из экстрактов вида *Galeopsis segetum* и *Galeopsis tetrahit* и их смесей.

3. Синергетическая композиция по п.2, где экстракт растения рода *Galeopsis* представляет собой сухой экстракт, который можно получить способом, включающим следующие стадии:

- измельчение по меньшей одной части растения рода *Galeopsis*;
- экстрагирование растворителем, предпочтительно физиологически приемлемым растворителем;
- фильтрование экстракта;
- очистка фильтрованного экстракта, предпочтительно путем элюирования растворителем из колонки;
- сушка очищенного экстракта;
- измельчение высушенного очищенного экстракта и,
- необязательно, добавление эксципиентов.

4. Синергетическая композиция по п.3, где эксципиенты включают мальтодекстрин и/или коллоидный безводный силикагель.

5. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-4, где спермидин присутствует в композиции в форме тригидрохлорида.

6. Топический препарат, включающий синергетическую композицию по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один эксципиент, подходящий для топического введения.

7. Топическая композиция по п.6, где количество экстракта растения рода *Galeopsis* находится в интервале 0,0003 мас.% - 0,01 мас.% относительно общей массы композиции.

8. Топический препарат по п. 6 или п.7, где количество биотина находится в интервале 0,0006 мас.% - 0,075 мас.% относительно общей массы композиции.

9. Топический препарат по любому из пп. 6-8, где композиция включает R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой метил или водород, в интервале 0,0005-0,1 мас.% относительно общей массы композиции.

10. Топический препарат по любому из пп. 6-9, где препарат находится в форме, выбранной из группы, включающей шампунь, гель, кондиционер, лосьон, бальзам, эмульсию, пенку, средство макияжа и крем.

11. Пероральный препарат, включающий синергетическую композицию по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один эксципиент, подходящий для перорального введения.

12. Пероральный препарат по п.11, где количество сухого экстракта растения рода *Galeopsis* в пероральном препарате находится в интервале 0,1 мг – 20 мг на одну дозу.

13. Пероральный препарат по п. 11 или 12, где количество биотина в пероральном препарате находится в интервале 0,03 мг – 0,08 мг на одну дозу.

14. Пероральный препарат по п. 11 или 12, где композиция включает R-N¹-спермидин или его соль, в которых R представляет собой метил или водород, в интервале 0,3 мг – 0,8 мг на одну дозу.

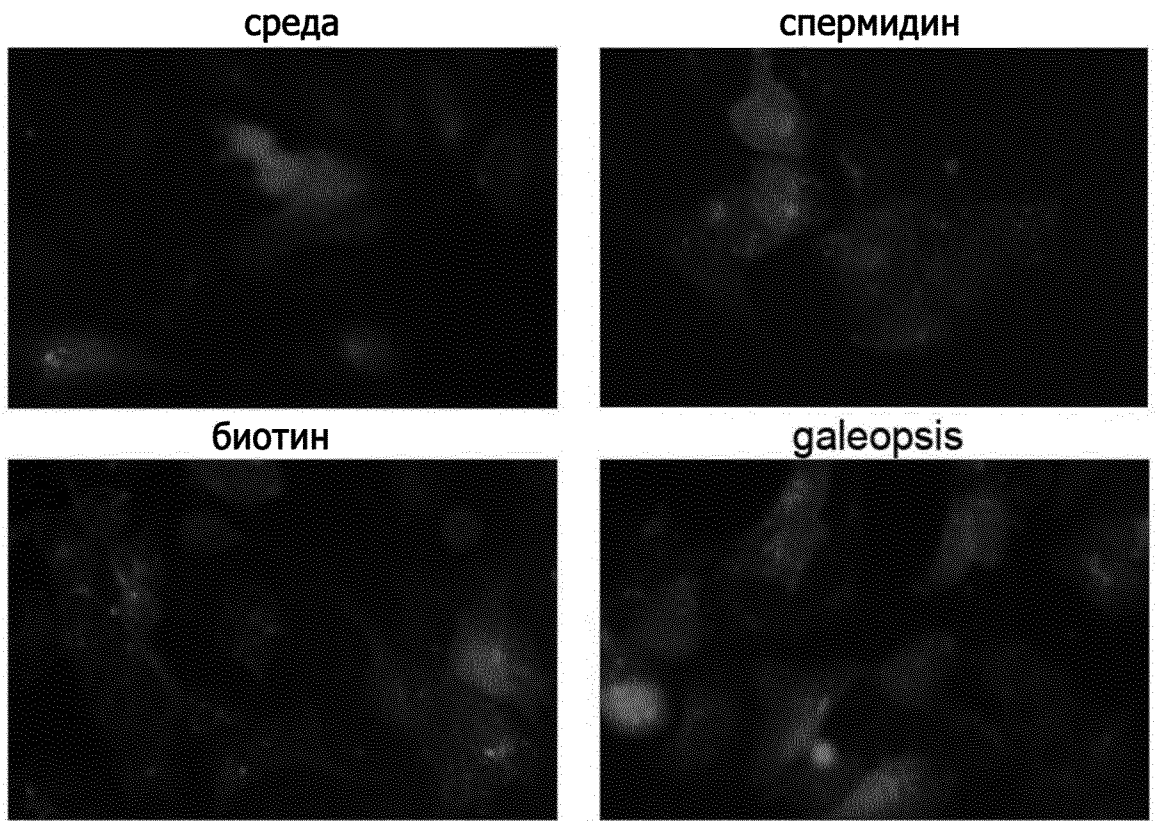
15. Пероральный препарат по любому из пп. 11-14, где препарат представляет собой твердый препарат, выбранный из группы, включающей таблетку, капсулу, порошки, гранулы или пилюлю.

16. Косметическое применение синергетической композиции по любому из пп. 1-5 или топического препарата по любому из пп. 6-10 или перорального препарата по любому из пп. 11-15 при промотировании роста волос и/или предупреждении потери волос.

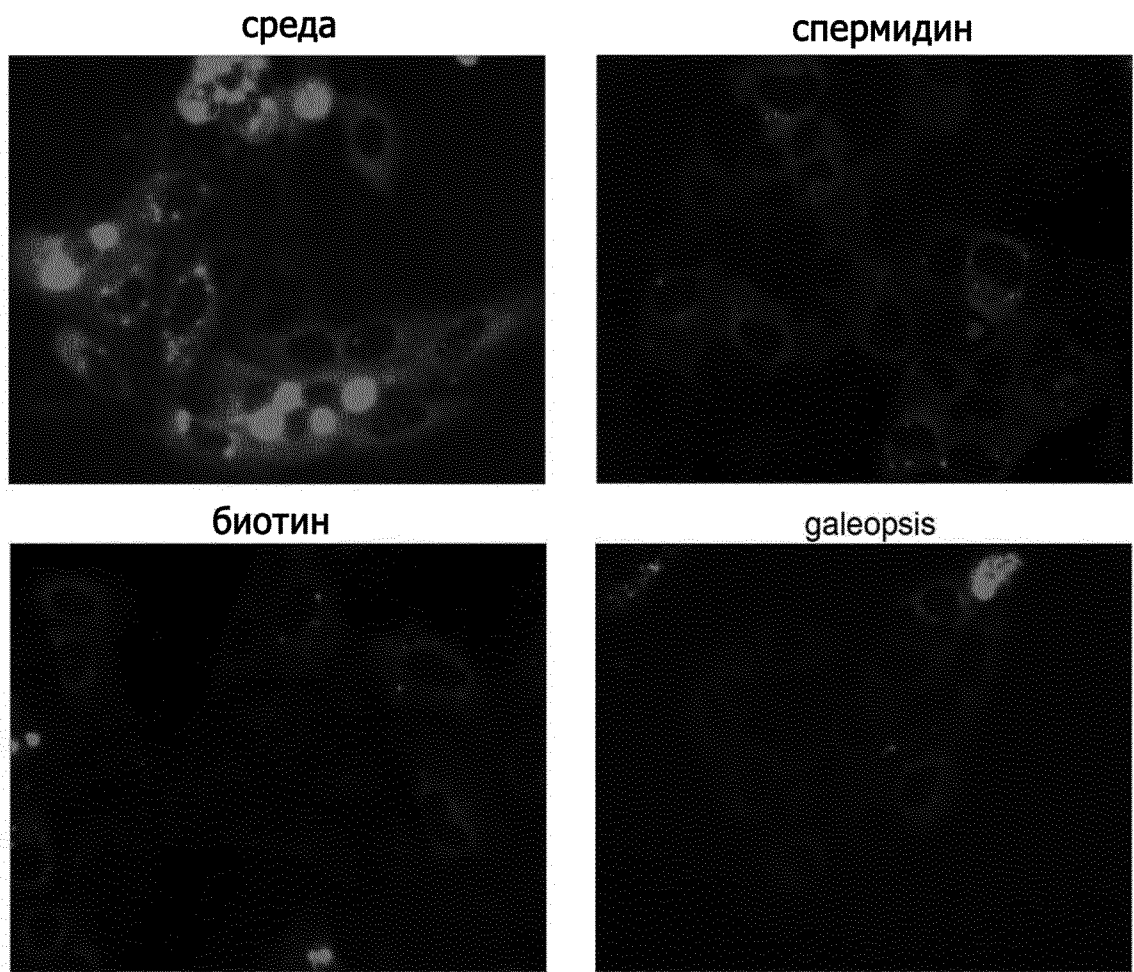
17. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-5 или топический препарат по любому из пп. 6-10 или пероральный препарат по любому из пп. 11-15 для применения при лечении андрогенной алопеции или облысения.

18. Синергетическая композиция по любому из пп. 1-5 для применения в качестве промотора аутофагии при лечении заболевания, модулируемого аутофагией.

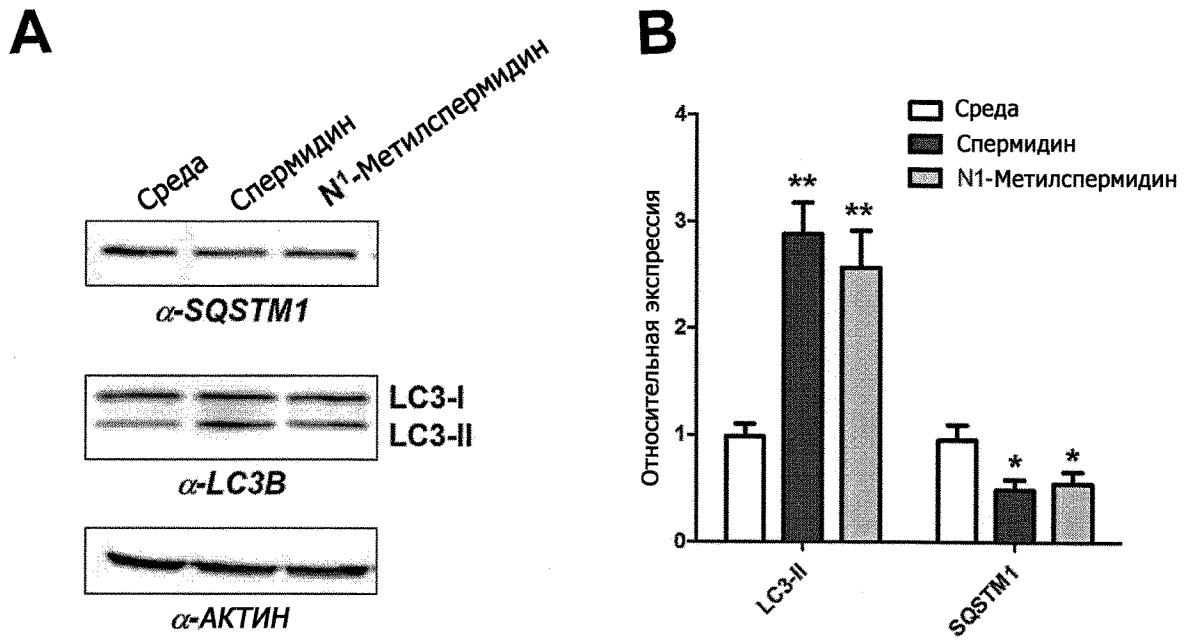
19. Синергетическая композиция для применения по п.18, где заболевания, модулируемые аутофагией, выбирают из группы, включающей нейродегенерацию, рак, болезнь Крона и кожные заболевания.



ФИГ. 1



Фиг. 2



ФИГ. 3