

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091933 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.12.29

(22) Дата подачи заявки  
2019.02.13

(51) Int. Cl. *A61Q 7/00* (2006.01)  
*A61K 8/49* (2006.01)  
*A61K 31/4155* (2006.01)  
*C07D 417/12* (2006.01)  
*C07D 277/54* (2006.01)  
*A61P 17/14* (2006.01)

---

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ РОСТА ВОЛОС

---

(31) 102018000002630  
(32) 2018.02.13  
(33) IT  
(86) PCT/EP2019/053591  
(87) WO 2019/158607 2019.08.22  
(71) Заявитель:  
ДЖУЛИАНИ С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:  
Джулиани Джаммария (CH), Марцани  
Барбара, Пинто Даньела, Барони  
Серджио (IT), Паус Ральф (DE),  
Хокшоу Нейтан (GB)  
(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к применению производных иминооксотиазолидина для предупреждения или лечения нарушений роста волос. Производные иминооксотиазолидина могут быть включены в композиции, подходящие либо для системного введения, либо для местного нанесения на кожу головы.

---

202091933  
A1

202091933

A1

## **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ РОСТА ВОЛОС**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции для лечения нарушений роста волос.

В частности, настоящее изобретение относится к косметической/трихологической области и области питательных продуктов и касается составов или добавок, подходящих для стимулирования физиологического роста волос и предупреждения или лечения выпадения волос.

Уровень техники

Волосы выполняют защитную функцию и рассматриваются в качестве дополнения к коже наряду с сальными железами, потовыми железами и ногтями.

Жизненный цикл волосистой луковицы включает три основные фазы: фазу роста, известную как анаген, фазу инволюции, известную как катаген, и фазу покоя, известную как телоген.

Волосы на коже головы образуются волосистым фолликулом, органом кожи млекопитающих. Волосистые фолликулы не производят волосы постоянно. Они циклически проходят стадию роста, которая может длиться два года или более, и регрессируют до стадии покоя на срок до двух месяцев, прежде чем снова начать отращать новое волосистое волокно.

Биологические фазы этого явления заключаются в способности стволовых клеток луковицы выходить, на чередующихся стадиях, из состояния покоя. Во время фазы роста луковицы и образования волос преобладают процессы пролиферации, дифференцировки и выживаемости, которые регулируются факторами роста. Фаза регрессии, напротив, характеризуется активацией молекулярных путей, которые индуцируют апоптоз клеток луковицы.

В фазе анагена сосочек дермы генерирует химические сигналы, активирующие и направляющие стволовые клетки утолщения, которые путем миграции в основание фолликула формируют матрицу волоса. Посредством такой «миграции» стволовые клетки утолщения создают «путь» клеток, который даст начало наружному корневому влагалищу или ORS.

В ответ на дальнейшие сигналы со стороны дермального сосочка, клетки матрицы, которые образуются из стволовых клеток, пролиферируют и запускают процесс

дифференциации, перемещаясь вверх для формирования стержня и внутренней оболочки волосяного фолликула.

Начало фазы катагена характеризуется концом клеточной пролиферации и апоптозом клеток матрицы. Во время катагена дермальный сосочек мигрирует в сторону самой нижней части утолщения. Считается, что эта непосредственная близость сосочка к утолщению необходима для инициации нового цикла продукции волос. Это обеспечивает взаимодействие/активацию клеток утолщения, находящихся в состоянии покоя, и новый цикл роста волос.

При переходе между катагеном и телогеном некоторые клетки утолщения мигрируют для достижения сосочка, формируя матрицу волоса.

Волосы в телогене содержат в своем основании популяцию клеток, которые фактически называют матрица волоса, расположенные в непосредственной близости от дермальных сосочков. Матрица волоса активируется к пролиферации к концу фазы телогена, еще до утолщения, формируя, в результате окружения сосочка, матрицу новой луковицы.

Различные факторы, среди которых стресс, недостаток питательных веществ и старение, негативно влияют на жизненный цикл волосяной луковицы, приводя к сокращению числа волос и их поредению.

Нарушения роста волос очень распространены, особенно среди мужского населения. Если учитывать роль волос в социальных отношениях, многим людям может быть трудно столкнуться с проблемой выпадения волос.

Одним из наиболее распространенных заболеваний волос является алоpecia, нарушение роста волос, которое может быть вызвано различными факторами, от генетики до окружающей среды. Степень и характер алопеции могут варьироваться, однако одной из наиболее распространенных форм алопеции является андрогенная алоpecia (AGA). Формы облысения, отличные от андрогенной алопеции, включают телогенную алопецию, очаговую алопецию, стригущий лишай, рубцовую алопецию и выпадение волос из-за чрезмерной косметической обработки.

У людей, страдающих андрогенной алопецией (AGA), с течением времени фолликулы, которые образуются вновь в начале новой фазы анагена, становятся меньше по размерам (миниатюризация), что приводит к образованию волос с меньшим диаметром по сравнению с диаметром на предыдущей стадии. Как следствие, происходит формирование микроскопических волос.

Дерматологи классифицируют алопецию, разделяя ее на рубцовые и нерубцовые

категории. Некоторые типы алопеции, такие как плоский лишай, дискоидная красная волчанка и болезнь «трансплантат против хозяина», связаны с разрушением стволовых клеток фолликула с утолщением и необратимым выпадением волос. При обратимых типах алопеции, таких как очаговая алопеция, воспаление поражает клетки-предшественники фолликула, но не затрагивает соответствующие стволовые клетки. При этих заболеваниях возобновление роста происходит при устранении воспаления и последующей регенерации волосяного фолликула из неповрежденных стволовых клеток.

У людей, страдающих андрогенной алопецией (AGA), с течением времени фолликулы, которые образуются вновь в начале новой фазы анагена, становятся меньше по размерам, что приводит к образованию волос с меньшим диаметром по сравнению с диаметром на предыдущей стадии. Как следствие, происходит формирование микроскопических волос. Было отмечено, что, хотя фолликулы волосистой части головы атрофируются, все еще остается источник стволовых клеток, которые превращаются в клетки-предшественники, хотя и в меньшей степени по сравнению с кожей головы в физиологических условиях.

В настоящее время доступно множество вариантов лечения нарушений роста волос, включая алопецию.

Первая линия лечения включает местное нанесение и/или введение составов для предотвращения и лечения нарушений роста волос. Большинство доступных на рынке составов для волос нацелены на волосяные луковицы и действуют на метаболизм, питание, насыщение кислородом и микроциркуляцию кожи головы, улучшая условия, способствующие физиологическому росту волос.

Обычно в эти трихологические продукты входят косметические ингредиенты для восстановления кожи и условий, подходящих для стимулирования роста волос.

Большое количество трихологических продуктов содержит антиоксидантные вещества, такие как витамин Е, гликозаминогликан, такой как гиалуроновая кислота, и витамины, такие как витамин А, и витамины группы В или их производные, такие как ниацин или никотинамидадениндинуклеотид (NAD).

Однако во многих случаях нанесение трихологических композиций, содержащих вышеуказанные и другие ингредиенты, на кожу головы или введение пищевых составов продемонстрировало слабый эффект на стимуляцию роста волос.

Трихологические продукты, содержащие фармакологически активные вещества в качестве трихологических ингредиентов, показали лучшую активность по сравнению с косметическими/трихологическими составами.

Среди этих фармацевтических продуктов хорошо известны составы, содержащие миноксидил, фармакологически активный ингредиент, обладающий сосудорасширяющей активностью. Эти продукты обычно представляют собой спиртовые растворы для местного применения.

Другие продукты, используемые для лечения заболеваний волос, включают фармацевтические композиции, содержащие финастерид, гормональное вещество. Эти продукты ингибируют 5-альфа-редуктазу типа II, фермент, преобразующий тестостерон в дигидротестостерон (ДГТ), гормон, который сокращает или уменьшает волосяные фолликулы и приводит к облысению, когда секреция превышает физиологическую продукцию.

Однако применение миноксидила и финастерида не лишено недостатков. В частности, местное применение миноксидила может привести к местным побочным эффектам, таким как кожная сыпь, местные воспаления, и к общим системным побочным эффектам, таким как головная боль, гирсутизм, в то время как пероральное введение финастерида может вызвать гормональные дисфункции.

Как следствие, все еще существует необходимость в обеспечении альтернативных средств лечения нарушений роста волос, которые были бы эффективными и, возможно, не имели бы серьезных побочных эффектов.

Одна из целей настоящего изобретения заключается в обеспечении новых применений в области трихологии для уже известных соединений.

Другая цель заключается в обеспечении композиции для стимуляции физиологического роста волос у субъектов, страдающих облысением или истончением волос.

Другой целью изобретения является обеспечение композиции как для косметического, так и для фармацевтического применения, которую можно вводить либо посредством местного, либо посредством системного пути введения.

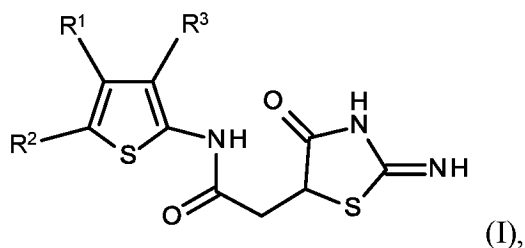
#### Краткая суть изобретения

В общих чертах, настоящее изобретение обеспечивает новые применения в косметической и трихологической области некоторых производных иминооксотиазолидина.

В соответствии с некоторыми аспектами авторы неожиданно обнаружили, что определенные производные иминооксотиазолидина, которые известны для использования при лечении остеопороза или других заболеваний, связанных с костями, стимулируют рост волос при их местном применении на коже головы или при систематическом

введении.

Таким образом, в соответствии с первым аспектом настоящее изобретение обеспечивает косметическое, нетерапевтическое применение производных иминооксотиазолидина формулы (I):



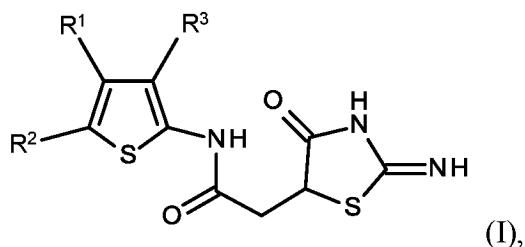
в которой

R<sub>1</sub> представляет собой H, линейный или разветвленный (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, циклоалкил, фенил, -CH<sub>2</sub>-NH-фенил;

R<sub>2</sub> представляет собой H, линейный или разветвленный (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, галоген, фенил;

R<sub>3</sub> представляет собой COO(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, CONR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, где R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> индивидуально представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> вместе образуют (C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил, конденсированный с тиофеновым кольцом, для лечения нарушений роста волос.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение обеспечивает производные иминооксотиазолидина формулы (I):



где

R<sub>1</sub> представляет собой H, линейный или разветвленный (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, циклоалкил, фенил, -CH<sub>2</sub>-NH-фенил;

R<sub>2</sub> представляет собой H, линейный или разветвленный (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, галоген, фенил;

R<sub>3</sub> представляет собой COO(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, CONR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, где R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> по отдельности представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> вместе образуют (C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил, конденсированный с тиофеновым кольцом, для применения в лечении нарушения роста волос или поражения.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение обеспечивает косметическое применение композиции, содержащей соединение формулы I и

физиологически приемлемый носитель, для стимуляции физиологического роста волос.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция по изобретению представляет собой косметическую композицию, подходящую для местного применения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция для косметического применения представляет собой косметическую композицию, пищевую добавку или нутрицевтическую композицию, которые можно вводить в режим питания субъекта, страдающего трихологическим нарушением, таким как выпадение волос, утолщение или обесцвечивание волос.

Авторы изобретения наблюдали, что производные иминоксотиазолидина формулы (I) при местном или системном введении субъекту, страдающему поредением или выпадением волос, вызывают постепенное загущение более поредевших участков кожи головы.

В соответствии с некоторыми аспектами предлагается композиция, содержащая производные иминоксотиазолидина формулы (I) и физиологически приемлемый носитель для применения в лечении нарушений роста волос.

Согласно определенным вариантам осуществления композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию.

Обычно композиция по изобретению содержит трихологически или фармацевтически активное количество производных иминоксотиазолидина формулы (I).

Некоторые аспекты и преимущества изобретения далее описаны со ссылкой на прилагаемые чертежи.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано 3-6-кратное увеличение экспрессии гена *Lef1*, достигнутое путем его стимуляции двумя соединениями по изобретению, обозначенными как C1 и C5 в примере 4, по сравнению с показателями, достигаемыми с помощью одного лишь носителя.

На фиг. 2 показаны дополнительные тесты с целью демонстрации активности соединений иминоксотиазолидина по изобретению в отношении стимуляции роста волос, особенно тех, которые представлены в следующей далее Таблице I, с использованием линии клеток волос (клетки сосочков дермы).

#### Подробное описание изобретения

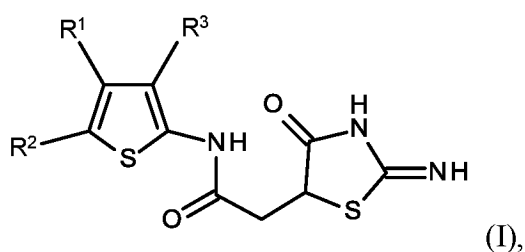
В соответствии с некоторыми аспектами изобретения авторы обнаружили, что выбранный класс производных иминоксотиазолидина формулы (I) нашел применение в

области трихологии и полезен для предупреждения или лечения нарушений роста волос.

Соединения формулы (I) можно применять для предупреждения или лечения трихологических нарушений или нарушений роста волос.

Заявитель обнаружил, что соединения формулы (I) проявляют трихологическую активность и стимулируют активность клеток фолликулов и находящихся в состоянии покоя волосяных луковиц кожи головы. Эти действия активируют жизненный цикл волосяных фолликулов, способствуя росту волос.

Таким образом, в соответствии с первым аспектом настоящее изобретение обеспечивает косметическое/нетерапевтическое применение соединений иминооксотиазолидина формулы (I):



где

$R_1$  представляет собой H, линейный или разветвленный  $(C_1-C_6)$ алкил, предпочтительно  $(C_1-C_3)$ алкил,  $(C_3-C_6)$ циклоалкил, фенил,  $-CH_2-NH$ -фенил;

$R_2$  представляет собой H, линейный или разветвленный  $(C_1-C_6)$ алкил, предпочтительно  $(C_1-C_3)$ алкил, галоген, фенил;

$R_3$  представляет собой  $COO(C_1-C_6)$ алкил, предпочтительно  $COO(C_1-C_3)$ алкил,  $CONR_4R_5$ , где  $R_4$  и  $R_5$  по отдельности представляют собой H или  $(C_1-C_6)$ алкил, предпочтительно  $(C_1-C_3)$ алкил, или  $R_1$  и  $R_2$  вместе образуют  $(C_5-C_7)$ циклоалкил, конденсированный с тиофеновым кольцом, для стимуляции роста волос или предупреждения или замедления выпадения волос.

Предпочтительным галогеном является Br.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $R_1$  представляет собой H или  $(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно метил;  $R_2$  представляет собой H, галоген, предпочтительно Br или  $(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно  $CH_3$ , и  $R_3$  представляет собой  $COO(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно метиловый или этиловый эфир.

В некоторых вариантах осуществления  $R_1$  представляет собой H или  $(C_1-C_3)$ алкил,

$R_2$  представляет собой H или галоген, предпочтительно Br,

$R_3$  представляет собой  $COOCH_3$  или  $COOCH_2CH_3$ .

Предпочтительные соединения формулы (I) имеют следующие группы заместителей:

$R_1$  представляет собой метил,  $R_2$  представляет собой Br и  $R_3$  представляет собой COOэтил;

$R_1$  представляет собой метил,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой COOэтил;

$R_1$  представляет собой H,  $R_2$  представляет собой H и  $R_3$  представляет собой COOметил;

$R_1$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-NH-фенил}$ ,  $R_2$  представляет собой Br и  $R_3$  представляет собой COOэтил.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаются соединения формулы (I), представленные в следующей таблице 1, предпочтительно соединения C1, C5, C7, C17, которые являются более активными, особенно соединения C1 и C5.

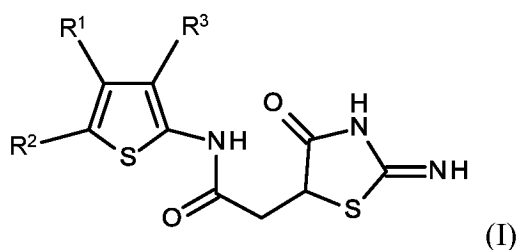
Наиболее предпочтительными соединениями являются метиловый эфир 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты и этиловый эфир 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметилтиофен-3-карбоновой кислоты.

Согласно изобретению соединения формулы (I) являются полезными в косметической области для предупреждения или лечения потери волос, выпадения волос, для предупреждения поседения или для косметического лечения седых волос. Соединения формулы (I) также являются полезными для улучшения эстетического аспекта волос, такого как пигментация волос.

Обычно соединения формулы (I) стимулируют физиологический рост волос и загущение волос.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение касается фармацевтического применения соединений формулы (I) для лечения нарушений/поражений роста волос.

В соответствии с этим последним аспектом предложены соединения иминооксотиазолидина формулы (I):



где

$R_1$  представляет собой H, линейный или разветвленный ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )алкил,

предпочтительно (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)циклоалкил, фенил, -CH<sub>2</sub>-NH-фенил;

R<sub>2</sub> представляет собой H, линейный или разветвленный (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, предпочтительно (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, галоген, фенил;

R<sub>3</sub> представляет собой COO(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, предпочтительно COO(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, CONR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, где R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> индивидуально представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, предпочтительно (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> вместе образуют (C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил, конденсированный с тиюфеновым кольцом, для применения в лечении нарушений или поражений роста волос.

Предпочтительным галогеном является Br.

Нарушения или поражения роста волос, которые можно лечить в соответствии с этим аспектом изобретения, включают алопецию и телогеновую алопецию, нарушения, затрагивающие субъектов мужского и женского пола. Композиция также подходит для лечения или предупреждения по женскому типу или андрогенной алопеции.

Соединения иминооксотиазолидина и способ их получения раскрыты в международной заявке на патент WO 2006124887 на имя Wyeth Corp., США.

В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение обеспечивает косметическое, нетерапевтическое применение композиции, содержащей соединение иминооксотиазолидина формулы (I) в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше в настоящем документе, и физиологически приемлемый носитель, для стимуляции физиологического роста волос. Композиция по настоящему изобретению эффективна для предупреждения и/или лечения форм облысения или поредения волос, как описано выше.

Композиция для косметического применения предназначена либо для местного, либо для системного введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция для перорального введения представляет собой функциональный пищевой продукт, нутрицевтическую композицию, диетический продукт для лечебного питания, добавку или питательное изделие или медицинское устройство.

Функциональный пищевой продукт означает любой модифицированный продукт питания или пищевой ингредиент, которые могут обеспечить преимущества или защиту от недостатков или физиологического состояния, помимо традиционных питательных веществ, которые он содержит.

Нутрицевтический продукт означает продукт, выделенный или очищенный из пригодного к употреблению в пищу вещества. Нутрицевтический продукт является

таковым, когда он демонстрирует наличие физиологического преимущества или обеспечивает защиту от недостатка или физиологического нарушения.

Независимо от способов введения, косметическая композиция увеличивает жизнеспособность клеток фолликулов во время фазы анагена и активирует покоящиеся клетки кожи головы, стимулируя метаболизм фолликулов и рост новых волос.

В соответствии с четвертым аспектом обеспечена композиция, содержащая соединение иминооксотиазолидина формулы (I) согласно любому из вариантов реализации, описанных выше, и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в лечении нарушений роста волос.

Примеры нарушений роста волос, которые лечатся этими композициями, включают алопецию и телогеновую алопецию. Обычно эти композиции составляют в виде фармацевтических композиций.

Количество активных соединений формулы (I) в композициях для косметических/фармацевтических/диетических применений является таким, чтобы достигалась профилактическая или терапевтически эффективная дозировка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция как для косметического, так и для медицинского применения может содержать соединение иминооксотиазолидина формулы (I) в количестве 0,0001-15 мас.%, 0,001-10 мас.% или 0,1-3 мас.%.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, обладающих трихологической активностью.

Вводимое количество и частота введения композиции будут зависеть от типа и тяжести трихологического состояния, подлежащего лечению.

В некоторых вариантах осуществления композиции как для косметического, так и для терапевтического применения дополнительно включают дополнительные ингредиенты, такие как витамины, например витамин А, витамин С, витамины группы В, ниацин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция по изобретению дополнительно содержит аминокислоту, в частности серосодержащую аминокислоту, такую как L-цистеин или L-метионин, особенно для составов для перорального введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция по изобретению также включает один или микро питательных микроэлементов и/или

минералов или питательных микроэлементов, таких как Mg, Zn, Ca, Fe, Cr, Se и другие, особенно в случае составов для перорального введения.

В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно содержать добавочные вещества, такие как фолиевая кислота, пантотенат кальция, мукополисахариды, такие как гиалуроновая кислота, или производные сои, такие как изофлавоны сои.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению как для косметического, так и для медицинского применения содержит физиологически и/или фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Обычно физиологически приемлемый носитель композиции по изобретению представляет собой вспомогательное вещество, носитель или разбавитель, подходящий для местного применения и/или системного введения. Физиологически и фармацевтически носители могут быть одними и теми же носителями.

В рамках настоящего документа термин «носитель» относится к вспомогательному веществу, носителю, разбавителю или адъюванту, которые могут присутствовать в композиции по изобретению. В контексте желаемой формы введения препарата рассматривается любой носитель и/или вспомогательное вещество, подходящие для применения растительного экстракта или присутствующих в нем активных ингредиентов, описанных в настоящем документе.

Обычно подходящий носитель представляет собой физиологически приемлемый, пищевой или фармацевтически приемлемый носитель.

Обычно композиции для перорального введения могут содержать один или несколько пищевых носителей.

Для целей настоящей заявки термин «пищевой» предназначен для обозначения продуктов пищевого качества, которые одобрены регулирующими органами для нутрицевтического применения или применения в качестве пищевой добавки. Термин «трихологическое нарушение» означает любые состояния, при которых наблюдается изменение физиологического состояния волос, особенно изменение эстетического вида волос. Композиции по настоящему изобретению включают любые композиции, полученные путем смешивания соединения формулы (I) и физиологически приемлемого носителя. Такие композиции подходят для пищевого, фармацевтического или диетического применения у млекопитающих, особенно у людей.

Носитель может иметь множество подходящих форм в зависимости от формы

препарата, которую желательно использовать для системного и для местного введения.

Соответственно, физиологически и/или фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество могут быть выбраны на основании пути введения, для которого предназначена композиция.

Композиции для перорального введения могут быть в твердой или жидкой форме.

Типичные композиции в твердой форме включают таблетки, капсулы, порошки, гранулы, пилюли. Если это желательно, таблетки могут быть покрыты подходящим полимерным агентом или агентом для достижения замедленного/продолжительного высвобождения с использованием известных методик.

Примеры вспомогательных веществ, используемых в твердых формах, включают производные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиэтилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, ацетат-бутират целлюлозы, ацетат-фталат целлюлозы и их смесь.

Дополнительные примеры подходящих вспомогательных веществ включают полимеры класса лактамов, обычно пирролидон и его производные, такие как поливинилпирролидон, поливинилполипирролидон и их смеси, неорганические соли, например кальция или дикальция фосфат, смазывающие вещества, например стеарат магния, триацетилглицерина и их смеси.

Таблетки, пилюли, капсулы и т.п. могут также содержать связующее вещество, такое как трагакантовая камедь, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как дикальций фосфат; разрыхлитель, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; и подслащивающий агент, такой как сахароза, лактоза, сахарин или другие подсластители. Когда стандартная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как жирное масло.

В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно включает один или несколько дополнительных компонентов, таких как добавки, наполнители, стабилизаторы, эмульгирующие, текстурирующие, пленкообразующие, пластифицирующие, смачивающие агенты и загустители.

Различные другие материалы могут присутствовать в качестве покрытий или для модификации физической формы дозированной единицы. Например, таблетки могут быть покрыты шеллаком, сахаром или ими обоими. Сироп или эликсир могут содержать,

помимо активного ингредиента, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Чтобы предотвратить разрушение во время прохождения через верхний отдел желудочно-кишечного тракта, композиция может представлять собой состав с энтеросолюбильным покрытием.

Типичные композиции в жидкой форме для перорального введения включают растворы, суспензии, сиропы, эмульсии, гели.

В этих формах введения подходящие носители включают воду, гликоли или эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, содержащие диспергированные в них соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят системным путем, особенно путем инъекции. В композиции для целей инъекции соединение формулы (I) или его фармацевтически соли растворены в фармацевтически приемлемом растворителе, таком как вода для инъекции. Композиция для инъекции может дополнительно содержать по меньшей мере одно из системы буфер/буфер, консервантов, сорастворителей или добавок.

В некоторых вариантах осуществления способ введения композиции по изобретению является местным. Композиции для местного применения могут быть в твердой, полужидкой или жидкой форме. Обычно композицию для местного применения наносят на кожу и, в частности, на кожу головы в эффективном количестве.

Например, для косметического применения косметически активное количество композиции по настоящему изобретению можно наносить непосредственно на кожу головы один или несколько раз в день, что удобно для циклов продолжительностью 2-3 месяца, чередующихся с периодами отдыха.

Композиция для местного применения может быть в твердой, полутвердой или жидкой форме.

Подходящие составы в твердой форме включают кремы, гели, пасты, мази.

В других вариантах осуществления состав для местного применения находится в жидкой форме, например в форме лосьонов, гелей, шампуней, суспензий, эмульсий.

В случае составов в жидкой или полужидкой форме соединение формулы (I) может быть разбавлено в носителе в физиологически приемлемой жидкой форме, таком как вода, спирт, водно-спиртовой или глицериновый раствор, или смешано с другими жидкостями, подходящими для местного нанесения.

В форме раствора, суспензии или дисперсии композиция по настоящему

изобретению может содержать примерно 1-99,9% жидкости, такой как вода, необязательно в смеси со спиртом. В некоторых вариантах осуществления вода присутствует в количестве 5-95%. В других вариантах осуществления вода присутствует в количестве 10-90% по массе.

Типичная композиция для местного применения представляет собой водно-спиртовой раствор, содержащий растворенное в нем соединение формулы (I).

В качестве примера, композиции по изобретению в жидкой форме могут быть получены путем растворения водорастворимых компонентов и остальных компонентов в спирте с последующим объединением различных фракций при перемешивании. Затем полученная смесь может быть забуферена для достижения значения pH в интервале от 5 до 7 для достижения совместимости со значением pH кожи головы, затем подвергнута фильтрации и упакована в подходящие контейнеры, такие как бутылки или флаконы.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению находится в форме лосьона для наружного применения.

Обычно активные соединения формулы (I) в фармацевтических композициях составляют в виде единиц дозирования. Единица дозирования может содержать от 0,1 до 1000 мг активного ингредиента на единицу дозирования для ежедневного введения.

В некоторых вариантах осуществления количества, эффективные для состава, будут зависеть от тяжести заболевания или состояния, подлежащего лечению. В некоторых вариантах осуществления дозировка находится в пределах от 0,001% по массе до около 60% по массе состава.

В соответствии с некоторыми аспектами изобретение относится к композициям для местного применения, которые являются полезными для стимуляции волосяных фолликулов, что дает положительный эффект при лечении нарушений роста волос, таких как алопеция, в частности, у женщин. Способы лечения соответствующих популяций также входят в объем данного изобретения.

Согласно другому аспекту изобретения предлагается способ косметического лечения, который включает нанесение на кожу головы эффективного количества композиции описанного ранее типа.

Например, для местного применения косметически или фармацевтически активное количество композиции по настоящему изобретению наносят непосредственно на кожу головы один или несколько раз в день, что удобно для циклов продолжительностью 2-3 месяца, чередующихся с периодами отдыха.

Следующие ниже примеры представлены только для иллюстрации настоящего

изобретения и не предназначены для ограничения объема защиты, вытекающей из прилагаемой формулы изобретения.

#### Пример 1

Таблетка для перорального введения, содержащая соединение формулы (I), для стимуляции роста волос

| Ингредиент                                                                                               | К-во (мг) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Микрокристаллическая целлюлоза                                                                           | 60 – 120  |
| Гидроксипропилметилцеллюлоза К100                                                                        | 20 – 60   |
| 2-(2-(2-Имино-4-оксо-тиазолидин-5-ил)-ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты этиловый эфир | 5 - 30    |
| Стеарат магния                                                                                           | 5 - 10    |
| Диоксид кремния                                                                                          | 10 – 20   |
| Поливинилпирролидон К30                                                                                  | 5 – 10    |
| Гиалуроновая кислота                                                                                     | 0,5 – 2,0 |
| Полиэтиленгликоль                                                                                        | 5 – 10    |
| Метакриловая кислота - метилметакрилат сополимер                                                         | 10 - 20   |
| Триэтилцитрат                                                                                            | 1,5 - 3   |
| Полисорбат 80                                                                                            | 0,5 – 1,0 |
| Диоксид титана                                                                                           | 1,5 - 2,5 |
| Тальк                                                                                                    | 3 - 6     |

#### Пример 2

Лосьон для местного нанесения, содержащий соединение формулы (I), для стимуляции роста волос

| Ингредиент                                                                                                | К-во (мг)   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Вода                                                                                                      | 1350 - 1850 |
| Гидроксипропилтримония гиалуронат                                                                         | 1,3 - 3,8   |
| Этанол                                                                                                    | 1900 - 2600 |
| 2-(2-(2-Имино-4-оксо-тиазолидин-5-ил)-ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты метиловый эфир | 0,01 – 1,00 |
| Молочная кислота 80%                                                                                      | 7 – 10      |
| PEG-40 Гидрогенизированное касторовое масло                                                               | 35 – 45     |
| Октадецил ди-т-бутил-4-гидроксигидроциннамат                                                              | 1,5 - 2,0   |
| Лецитин                                                                                                   | 1,5 - 2,0   |
| Fomblin HC/PU-CAT5                                                                                        | 0,6 - 0,8   |

#### Пример 3

Композиция для местного нанесения, содержащая соединение формулы (I), для

лечения алопеции

| Ингредиент                                                                                                | К-во (мг)   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Вода                                                                                                      | 940 – 2800  |
| Этанол                                                                                                    | 900-1800    |
| Гидроксипропилтримония гиалуронат                                                                         | 3 - 4       |
| Ацетил L-карнитин гидрохлорид                                                                             | 17 – 23     |
| Кофеин                                                                                                    | 2 – 3       |
| L-Аргинин гидрохлорид                                                                                     | 2 – 3       |
| Пантотенат кальция                                                                                        | 6,5 - 8, 5  |
| 2-(2-(2-Имино-4-оксо-тиазолидин-5-ил)-ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты метиловый эфир | 0,01 – 1,00 |
| Молочная кислота 80%                                                                                      | 2 – 3       |
| Биотин                                                                                                    | 0,5 -0,8    |
| PEG-40 Гидрогенизированное касторовое масло                                                               | 700 – 1000  |
| Лецитин                                                                                                   | 17 – 23     |
| Отдушка                                                                                                   | 2,0 – 2,5   |
| Сухой экстракт <i>Ajuga Reptans</i>                                                                       | 8,5 - 11,5  |
| Fomblin HC/PU-CAT5                                                                                        | 0,7 - 1,1   |

#### Пример 4

Экспериментальные доказательства.

Доказательство активности соединений по изобретению обеспечивается экспрессией фактора связывания лимфоидного энхансера-1 (Lef1), который играет важную роль в росте и дифференцировке стволовых клеток (International Journal of Medical Sciences 2013; 10(6):738-746).

Тестируемые соединения

Были протестированы следующие соединения:

C1: метиловый эфир 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметилтиофен-3-карбоновой кислоты;

C5: этиловый эфир 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметилтиофен-3-карбоновой кислоты.

Эти продукты растворяли в DMSO (исходный раствор) и готовили промежуточные или рабочие растворы, разбавляя исходный раствор или промежуточный раствор в среде Е Вильямса.

Органная культура волосяного фолликула (HF)

Волосные фолликулы (HF) получали микродиссекцией кожи скальпа человека в

фазе анагена VI (культивировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в минимальной среде Е Вильямса (Gibco, Life Technologies), дополненной 2 mM L-глутамина (Gibco), 10 нг/мл гидрокортизона (Sigma-Aldrich), 10 мкг/мл инсулина (Sigma-Aldrich) и 1% смесью пенициллина/стрептомицина (Gibco) для получения полной среды Вильямса (Williams Complete Media, WCM), как описано ранее (Philpott et al., 1990; Kloepper et al., 2010 ; Langan et al., 2015). Через 24 ч среду заменяли свежей средой, содержащей либо WCM с конечной концентрацией 0,1% DMSO (носитель), либо тестируемые соединения в конечных концентрациях 15 мкМ для C1 и C5. Для qRT-ПСТ РНК извлекали из волосяных фолликулов, обработанных в течение лишь 6 часов.

Анализ qRT-PCR (количественная ПЦР в реальном времени)

РНК экстрагировали из волосяных фолликулов с помощью набора RNeasy (Qiagen, США) и подвергали обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК Tetro (Bioline) в соответствии с инструкциями производителя. qPCR выполняли в QuantStudio3 (Thermo Fisher) с зондом Taqman для Axin2 (Hs00610344\_m1, Thermo Fisher), Lef1 (Hs01547250\_m1, Thermo Fisher), b-актина (Hs01060665\_g1, Life Technologies) и Gapdh (Hs01060665\_g1, Life Technologies). Уровни экспрессии рассчитывали методом дельта-дельта СТ.

Полученные результаты

Lef-1 (генная экспрессия)

В следующей таблице представлена генная экспрессия Lef1 (мРНК) в фолликулах, обработанных носителем, C1 и C5.

Экспрессию Lef1 нормализовали в среднем по домашнему хозяйству (GAPDH). N = 8 HF/группу от 1 донора.

|         | Носитель | C1    | C5    |
|---------|----------|-------|-------|
| среднее | 1        | 3,425 | 6,134 |
| SEM     | 0,01     | 0,251 | 0,326 |

Экспрессия при использовании соединений C1 и C5 показывает увеличение в 3-6 раз по сравнению с экспрессией, полученной при использовании только носителя.

Результаты показаны на фиг. 1.

Пример 5 (фиг. 2)

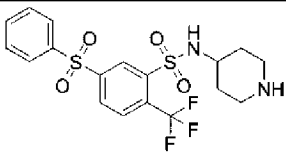
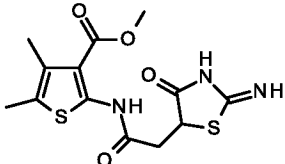
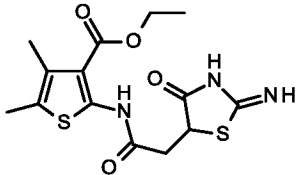
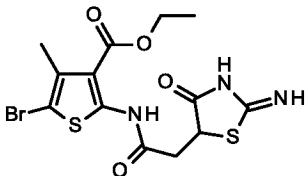
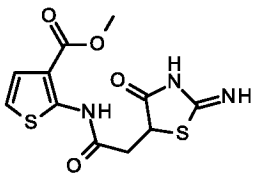
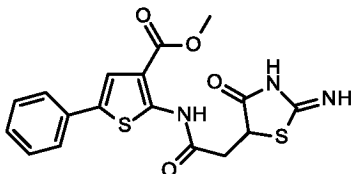
Дополнительные тесты с целью оценки активности соединений иминооксотиазолидина по изобретению в отношении стимулирования роста волос, особенно тех, которые представлены в следующей таблице I.

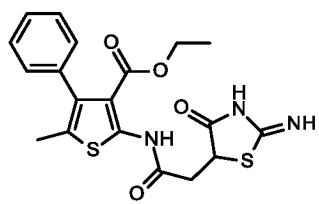
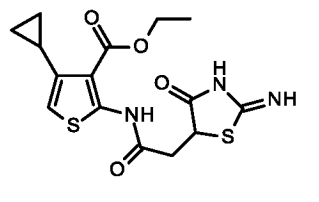
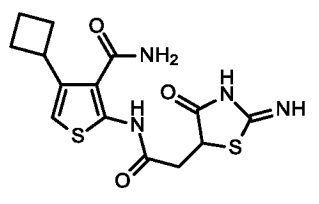
В настоящем тесте использовали линию клеток волос (клетки сосочков дермы), а

не волосяные фолликулы человека, как в эксперименте в примере 4.

Авторы оценивали стимуляцию Lef1 (маркера роста волос) и повторно тестировали соединение 1 и соединение 5, и также включали в исследование соединение WAY-316660, относительно нетоксичный специфический антагонист SFRP1, который уже применялся для лечения остеопороза, так как известна его активность в отношении стимулирования роста волос (Rif. Hawkshaw et al. Plos Biol, 2018; <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003705>).

Таблица I. Протестированные соединения

| Соединение                                                                                                                     | Формула                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| WAY-316606 (положительный контроль)                                                                                            |    |
| Соединение 1 (C1)<br>2-(2-(2-Имино-4-оксо-тиазолидин-5-ил)-ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты метиловый эфир |   |
| Соединение 5 (C5)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>3</sup> на тиофеновом осто́ве)                                           |  |
| Соединения 7 (C7)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>2</sup> -R <sup>3</sup> на тиофеновом осто́ве)                           |  |
| Соединение 17 (C17)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> на тиофеновом осто́ве)                         |  |
| Соединение 18 (C18)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> на тиофеновом осто́ве)                         |  |

|                                                                                                                              |                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Соединение 20 (C20)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>1</sup> -R <sup>3</sup> на тиафеновом остоле)                        |  |
| Соединение 21 (C21)<br>(Замещение соединения 1 в R <sup>1</sup> (циклоалкильная группа)-R <sup>3</sup> на тиафеновом остоле) |  |
| Соединение 24 (C24)                                                                                                          |  |

Биологическая модель

Клетки сосочков дермы волосяного фолликула человека (HFDPC)

Клетки сосочков дермы волосяного фолликула человека (HFDPC) приобретали у фирмы Promocell (Германия).

Клеточную линию культивировали в клеточной среде для сосочков дермы волосяного фолликула в культуральных колбах объемом 25 см<sup>2</sup> при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Каждые два дня конфлюэнтные культуры разделяли в соотношении 1:3 - 1:6 после промывания PBS 1X (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) с использованием трипсин/EDTA и высевали при 2-5x10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Среда для замораживания: Cryo-SFM. Количественная оценка клеток: анализ с использованием трипанового синего.

Контроли

Положительный контроль: Way316606

Отрицательный контроль: необработанные клетки в Follicle Dermal Papilla Cell в тех же условиях культивирования образца.

Способы

Экспрессию LEF1 исследовали с помощью RT-PCR. Анализ проводили в соответствии с описанным способом (Gibson et al, 1996; Heid et al, 1996) с использованием набора TaqMan для анализа экспрессии генов, поставляемого фирмой Applied Biosystems. Вкратце, в пределах пары ген-специфических олигонуклеотидных праймеров для PCR конструировали олигонуклеотидный зонд, меченный репортерным флуоресцентным

красителем (FAM) на 5'-конце и гасящим флуоресцентным красителем (TAMURA) на 3'-конце. Когда зонд находится в интактном состоянии, излучение репортерного красителя подавляется. Во время фазы удлинения цикла PCR благодаря нуклеолитической активности ДНК-полимеразы гибридизационный зонд расщепляется и репортерный краситель отщепляется от зонда. Интенсивность флуоресценции, возникающая во время ПЦР-амплификаций, контролируется детектором последовательности непосредственно в реакционной пробирке («в реальном времени»). Компьютерный алгоритм сравнивал интенсивность эмиссии репортерного красителя с эмиссией гасящего красителя и рассчитывал величину порогового цикла (СТ), когда сигналы достигали десятикратного стандартного отклонения от базовой линии, от которой были определены уровни мРНК, транскрибируемых из различных тестируемых генов (Gibson et al, 1996).

Анализ экспрессии генов включает четыре следующих стадии:

1. Обработка клеток активными соединениями в течение 24 ч;
2. Извлечение РНК;
3. Обратная («retro») транскрипция в кДНК;
4. Количественная RT-PCR.

День 1: Посев клеток

Когда клетки (клетки сосочков дермы волосяного фолликула человека) достигали приблизительно 80% конfluence, их собирали с помощью трипсин/EDTA и высевали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл в 12-луночные планшеты и затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (24 ч).

День 2-3: Химическое воздействие 24 ч

Когда клетки достигали приблизительно 80% конfluence, всю среду удаляли; клетки промывали один раз PBS 1X и инкубировали в клетках сосочков дермы волосяного фолликула человека при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение по меньшей мере 24 ч;

Тестируемые соединения (WAY316606, 1, 5, 7, 17, 18, 20, 21, 24) растворяли в DMSO и разводили до конечной концентрации в клетках сосочков дермы волосяного фолликула человека.

Также были включены контроли (только среда).

Затем клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч.

Извлечение РНК

Тотальные РНК извлекали из клеток с использованием реагента Tri Reagent (Thermo Fisher), который представлял собой единый гомогенный раствор для выделения тотальной РНК. Эта процедура является усовершенствованием одностадийного способа,

описанного (Chomczynski and Mackey, 1995) для выделения тотальной РНК. Tri Reagent, смесь гуанидина тиоцианата и фенола в однофазном растворе, эффективно растворяет ДНК, РНК и белок при гомогенизации или лизисе образца ткани, и содержит уникальную комбинацию денатурирующих веществ и ингибиторов РНКаз, и используется в удобной одностадийной процедуре разрушения/разделения.

Чистоту выделенной тотальной РНК оценивали путем считывания оптической плотности при 260 нм,  $\lambda$ , при которой нуклеиновая кислота имеет наибольшую оптическую плотность. Также, считывали оптическую плотность при 280 нм для оценки загрязнения белками или фенолом. При этом измерение оптической плотности при 230 нм и 330 нм обеспечивает информацию о чистоте как образцов, так и кюветы. РНК считается хорошего качества, если соотношение  $R = A_{260}/A_{280}$  составляет  $>1,6$ .

После определения концентрации и чистоты тотальной РНК каждый образец РНК разбавляли водой, обработанной диэтилпиروкарбонатом (DEPC), до конечной концентрации 2 мкг/мл. Это концентрация, требуемая для набора для обратной транскрипции (на следующей стадии).

Также, проводили электрофорез в геле для проверки целостности выделенной тотальной РНК.

#### PCR с обратной транскрипцией

Тотальную РНК, выделенную и количественно определенную, амплифицировали с использованием набора реагентов PRIME SCRIPT RT reagent kit (Perfect Real time) (Takara)).

Случайные праймеры использовали для обеспечения эффективного синтеза первой цепи мРНК.

Для амплификации использовали систему ПЦР в реальном времени Real time PCR System Mx3000P (Stratagene), и каждую тотальную РНК амплифицировали в двух повторях.

| Условия амплификации | Стадия 1: | Стадия 2: | Стадия 3:   |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|
| Температура          | 37°C      | 85°C      | 25°C        |
| Время                | 15 мин    | 5 сек     | удерживание |

После амплификации образцы разбавляли 30 мкл воды, обработанной DEPC, и хранили при -20°C до использования.

#### PCR в реальном времени

Анализ RT-PCR проводили с использованием линейных зондов TaqMan (Applied Biosystems). Эти зонды являются наиболее широко используемыми и опубликованными

химическими веществами для детекции для приложений qPCR.

Изученные зонды и праймеры выбирали в соответствии с более ранними конкретными библиографическими исследованиями.

Авторы использовали метод относительной количественной оценки, в котором относительную концентрацию интересующего гена (мишени) в неизвестных образцах сравнивают с калибратором или контрольным образцом (необработанные клетки). В настоящем документе калибратором является базовый уровень для экспрессии заданного гена-мишени. При использовании этого подхода различия в величине  $C_t$  между неизвестным образцом и калибратором выражаются в виде кратных изменений относительно образца калибратора. Помимо сравнения экспрессии одного гена-мишени в контрольном и экспериментальном образце, полезно нормализовать результаты с нормализующей мишенью, обычно с геном, экспрессия которого постоянна как в контрольном, так и в экспериментальном образце. GAPDH являлся геном домашнего хозяйства, используемым для нормализации результатов. При использовании этого типа количественной оценки нет необходимости строить стандартную кривую для каждого планшета, оценивая эффективность амплификации в 100%. Набор для анализа уровня экспрессии генов с использованием технологии TaqMan (TaqMan Gene Expression Assay), поставляемый фирмой Applied Biosystems, оптимизирован для следующего температурного профиля и обладает 100% эффективностью.

Изучали следующие гены:

| Название гена                   | TAQMAN ASSAY ID | Программа амплификации                      |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| GAPDH (ген домашнего хозяйства) | Hs99999905_m1   | 95°C 15 сек<br>60°C 60 сек<br>Для 40 циклов |
| LEF1                            | Hs01547250_m1   | 95°C 15 сек<br>60°C 60 сек<br>Для 40 циклов |

Экспериментальная процедура

RT-PCR выполняли с использованием кДНК из клеток, обработанных в разные моменты времени, контрольные клетки (необработанные) добавляли к 10 мкл 2X TaqMan Gene Expression Master Mix и 1 мкл 20X TaqMan Gene Expression Assay. Каждый биологический образец обрабатывали в двух повторах и амплифицировали как с помощью набора TaqMan для анализа экспрессии генов «домашнего хозяйства», так и с помощью набора TaqMan для анализа экспрессии гена-мишени. Также, в каждый прогон включали контроль без матрицы (NCT).

Термоциклер Stratagene MX3000P был запрограммирован следующим образом:

- 95°C, 30 сек (активация Amplitaq);
- 95°C, 5 сек (денатурация)
- 60°C, 20 сек (отжиг - удлинение)

| Стадия      | Стадия 1:<br>Активация<br>полимеразы Taq | Стадия 2: PCR    |                 |
|-------------|------------------------------------------|------------------|-----------------|
|             | Выдержка                                 | Цикл (40 циклов) |                 |
|             |                                          | Денатурация      | Отжиг/Удлинение |
| Температура | 95°C                                     | 95°C             | 60°C            |
| Время       | 30 сек                                   | 5 сек            | 20 сек          |

Сбор данных

Данные, полученные при помощи прибора Stratagene MX3000P, регистрировали с помощью внутреннего программного обеспечения MXPro v.4.01. После завершения амплификации программное обеспечение автоматически применяет способ  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  расчета различий в  $C_t$  между геном-мишенью в обработанных образцах и калибраторе, и скорректирует это на различие в значениях  $C_t$  для гена-нормализатора в обработанных образцах и образцах калибратора. Значения  $C_t$  мишени и нормализатора должны в идеальном случае находиться в пределах примерно десяти циклов друг от друга.

Результатом сравнительной квантификации является диаграмма относительных количеств. Значение, равное единице, указывает на отсутствие изменений в экспрессии гена-мишени между этим образцом и образцом калибратора. Все, что больше единицы, указывает на повышающее регулирование (upregulation), а все, что ниже единицы, указывает на пониженное регулирование (downregulation). Значение считается в значимом смысле приемлемым, если оно было один раз повышено или понижено относительно калибратора.

#### Результаты

После 24 часов инкубации все тестируемые соединения были способны индуцировать и стимулировать экспрессию мРНК LEF1 (фиг. 1). Также, WAY316606, используемый в качестве положительного контроля, оказывает такое индуктивное действие.

|            | Lef1                                   |       |
|------------|----------------------------------------|-------|
|            | кратность изменения<br>экспрессии мРНК | SEM   |
| Носитель   | 1                                      | 0,668 |
| WAY-316606 | 2,18                                   | 0,097 |
| C1         | 8,43                                   | 0,314 |
| C5         | 6,05                                   | 0,226 |

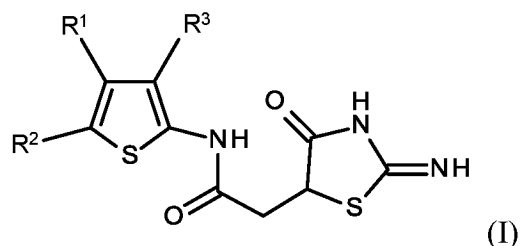
|     |      |       |
|-----|------|-------|
| C7  | 2,46 | 0,559 |
| C17 | 2,52 | 0,229 |
| C18 | 1,56 | 0,592 |
| C20 | 1,39 | 0,621 |
| C21 | 1,79 | 0,299 |
| C24 | 1,88 | 0,314 |

Значительная индукция Lef1 была получена при использовании соединений 1 и 5.

Через 24 ч все тестируемые соединения были способны подавлять экспрессию мРНК Lef1, как показано на фиг. 2. WAY316606, используемый в качестве положительного контроля, также оказывал такое ингибирующее действие.

## ИЗМЕНЁННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Косметическое применение соединения иминооксотиазолидина формулы (I):



где

$R_1$  представляет собой H,  $(C_1-C_6)$ алкил, циклоалкил, фенил,  $-CH_2-NH$ -фенил;

$R_2$  представляет собой H,  $(C_1-C_6)$ алкил, галоген, фенил;

$R_3$  представляет собой  $COO(C_1-C_6)$ алкил,  $CONR_4R_5$ , где  $R_4$  и  $R_5$  индивидуально представляют собой H или  $(C_1-C_6)$ алкил, или  $R_1$  и  $R_2$  вместе образуют  $(C_5-C_7)$ циклоалкил, конденсированный с тиюфеновым кольцом,

для стимулирования роста волос и/или предупреждения и/или уменьшения выпадения волос.

2. Применение по п. 1, где

$R_1$  представляет собой H или  $(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно метил,

$R_2$  представляет собой H, галоген, предпочтительно Br или  $(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно  $CH_3$ , и

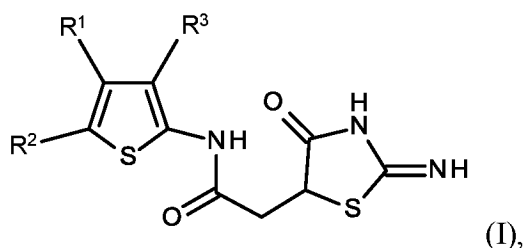
$R_3$  представляет собой  $COO(C_1-C_3)$ алкил, предпочтительно сложный метиловый или этиловый эфир.

3. Применение по п. 1 или 2, где соединение представляет собой метил 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты метиловый эфир или 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметилтиофен-3-карбоновой кислоты этиловый эфир.

4. Косметическое применение композиции, содержащей соединение иминооксотиазолидина формулы (I), как оно определено в любом из п.п. 1-3, и физиологически приемлемый носитель, для стимулирования роста волос и/или предупреждения и/или уменьшения выпадения волос.

5. Применение по п. 4, где композиция предназначена для местного или топического нанесения или для перорального введения.

6. Применение соединения иминооксотиазолидина формулы (I):



где

R<sub>1</sub> представляет собой H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, циклоалкил, фенил, -CH<sub>2</sub>-NH-фенил;

R<sub>2</sub> представляет собой H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, галоген, фенил;

R<sub>3</sub> представляет собой COO(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, CONR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, где R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> индивидуально представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> вместе образуют (C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил, конденсированный с тиюфеновым кольцом,

в предупреждении или лечении нарушения роста волос.

7. Применение по п. 6, где

R<sub>1</sub> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, предпочтительно метил,

R<sub>2</sub> представляет собой H, галоген, предпочтительно Br, или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, предпочтительно CH<sub>3</sub>, и

R<sub>3</sub> представляет собой COO(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, предпочтительно сложный метиловый или этиловый эфир.

8. Применение по п. 6 или 7, где соединение представляет собой 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметил-тиофен-3-карбоновой кислоты метиловый эфир или 2-(2-(2-имино-4-оксотиазолидин-5-ил)ацетиламино)-4,5-диметилтиофен-3-карбоновой кислоты этиловый эфир.

9. Фармацевтическая композиция для применения в предупреждении или лечении нарушения роста волос, содержащая соединение иминооксотиазолидина формулы (I), как оно определено в любом из п.п. 6-8, и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где композиция предназначена для местного/топического нанесения или для системного введения.