

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038745**

(13) **B1**

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

- |                                       |               |  |
|---------------------------------------|---------------|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 47/50</i> (2017.01)<br><i>A61K 8/49</i> (2006.01)<br><i>A61K 31/506</i> (2006.01)<br><i>A61Q 7/00</i> (2006.01)<br><i>C07K 7/06</i> (2006.01)<br><i>C07K 7/08</i> (2006.01)<br><i>C07K 19/00</i> (2006.01) |
| 2021.10.13                            |               |  |
| (21) Номер заявки                     |               |  |
| 201990526                             |               |  |
| (22) Дата подачи заявки               |               |  |
| 2017.08.04                            |               |  |

---

(54) **КОНЬЮГАТ МИНОКСИДИЛА И ПЕПТИДА**

---

- |  |                    |
|--|--------------------|
| (31) 10-2016-0105707   | (56) US-B2-7507719 |
| (32) 2016.08.19  | KR-A-1020090108323 |
| (33) KR  | KR-A-1020130015530 |
| (43) 2019.07.31  | WO-A1-2005092850   |
| (86) PCT/KR2017/008428   | WO-A2-2007113687   |
| (87) WO 2018/034453 2018.02.22                                   |                    |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br>КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR) |                    |
| (72) Изобретатель:<br>Чунг Йонг Джи, Ким Эюн Ми (KR)             |                    |
| (74) Представитель:<br>Медведев В.Н. (RU)                        |                    |

- 
- (57) Изобретение относится к композиции для предотвращения выпадения волос и более конкретно к соединению, имеющему структуру, в которой Миноксидил и пептид химически связаны, и к фармацевтической композиции или косметической композиции для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, включающей такое соединение. Соединение, имеющее структуру, в которой Миноксидил и пептид химически связаны, в соответствии с настоящим изобретением обладает не только отличной физиологической активностью, такой как снижение выпадения волос, стимуляция роста волос или стимулирование роста клеток, а также и превосходной стабильностью в воде, и поэтому может быть полезным в качестве композиции для предотвращения выпадения волос и стимуляции роста волос.

**B1**

**038745**

**038745**  
**B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к конъюгату Миноксидила и пептида и более конкретно к конъюгату Миноксидила и пептида, в котором имеет место эффект взаимного усиления активности каждого, с сохранением при этом соответствующих свойств Миноксидила и пептида.

### **Предпосылки к созданию изобретения**

Волосной фолликул представляет собой уникальный орган кожи млекопитающего, который образуется путем роста и расширения нижней части первичного эпидермиса в более глубокий слой кожи. Скопление клеток, известное как мешочек или дермальный сосочек, существует в основании волосного фолликула, и сосочек необходим для нормальной циркуляции волосного фолликула и роста волосного стержня. Волосной стержень имеет нитевидную структуру, образованную эпителиальными клетками, состоящими из кератиновых филаментов и филаментагрегирующих белков, плотно прикрепленных к ним.

Волосы человека периодически повторяют фазы анагена, катагена и телогена и проходят процесс выпадения и восстановления волос. Цикл волоса определяется гормональной регуляцией и многими факторами роста, и волосы рано вступают в фазу телогена через фазу катагена из-за сильного стресса или недостаточного питания, что вызывает серьезные симптомы выпадения волос.

Феномен потери волос из кожи головы называется выпадением волос, и факторы, влияющие на выпадение волос, могут включать факторы окружающей среды, такие как климат, воздействие света или тепла, а также внутренние факторы, такие как болезнь, роды, секреция и изменения гормонов, употребление лекарственных препаратов и состояние питания. Выпадение волос также может быть вызвано недостатком питания, иссушением кожи головы, стрессом и т.д. в дополнение к ферментативному действию. В случае выпадения волос, вызванного такими причинами, выпадение волос можно предотвратить при помощи достаточного восполнения питания, ухода за кожей головы и приема или введения антиоксидантов при одновременном стимулировании роста волос.

Для лечения такого явления выпадения волос до сих пор использовали в качестве лекарственных средств различные вещества, но они имели тот недостаток, что цена была слишком высокой или отдельные различия в эффективности были слишком значительными. Что касается других косметических продуктов, для них использовали растительные экстракты, которые были дешевле, но малоэффективны, и поэтому эффект был незначительным. Типичный пример лекарственного средства, используемого при выпадении волос, представляет собой Миноксидил. Миноксидил был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США и, как сообщалось, обладает активностью индуцирования фазы анагена из фазы телогена волосного цикла и поддержания цикла роста волос в индуцированной фазе анагена, помимо функции вазодилатора в качестве уникального агента открытия калиевых каналов. Однако Миноксидил может при использовании задерживать выпадение волос, но фактически не может быть использован для индукции регенерации новых волосных фолликулов. Кроме того, Миноксидил имеет низкую растворимость в воде и поэтому осаждается, и его трудно использовать. Для решения этих проблем, патентный документ 1 (Корейская выложенная патентная публикация № 10-2012-0011632) раскрывает метод добавления поверхностно-активного вещества при использовании Миноксидила.

Между тем существует много факторов, связанных друг с другом в процессе роста и дегенерации волос. Например, сообщалось об исследовании с использованием ряда факторов роста для стимулирования роста волос путем стимулирования фактора роста кератиноцитов, стимулирования активности фактора роста эндотелия сосудов, стимулирования пути WINT и ингибирования активности белков, вовлеченных в путь BMP. Однако факторы роста являются высокоэффективными, но требуют дополнительной обработки и времени для рефолдинга для получения естественного фактора роста, а также требуют сложного процесса очистки для удаления загрязнений от *E. coli* во время процесса очистки и являются менее полезными из-за проблем стабильности и высокой молекулярной массы и, таким образом, их неспособности легко преодолеть защитную мембрану волос, являясь при этом очень дорогими.

Соответственно авторы настоящего изобретения разработали пептиды, которые могут выполнять те же самые или сходные функции или действия, что и естественные факторы роста, но имеют лучшую стабильность, чем естественные факторы роста, и могут преодолевать проблемы, вызываемые большой молекулярной массой естественных факторов роста, а именно пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 (патентный документ 2: Корейская выложенная патентная публикация № 10-2010-0085407), пептид Keramin2, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (патентный документ 3: Корейская выложенная патентная публикация № 10-2009-0108323) и пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (патентный документ 4: Корейская выложенная патентная публикация № 10-2011-0023991).

Однако обычно используемый Миноксидил или пептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3, все еще нуждаются в улучшении с точки зрения предотвращения выпадения волос и улучшения характеристик, способствующих росту волос, уменьшения побочных эффектов и увеличения водорастворимости.

Для решения этих проблем авторами настоящего изобретения были получены пептиды Минокси-

дил-Nokkin, Миноксидил-Keramin 2 и Миноксидил-WINT путем химической конъюгации Миноксидила с пептидами, состоящими из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3 соответственно, и было подтверждено, что соединения промотируют активность фактора роста эндотелия сосудов, связанного с ростом волос, промотируют путь WINT и ингибируют активность белков, участвующих в выпадении волос в основном пути BMP, завершив, таким образом, создание настоящего изобретения.

### Раскрытие изобретения

Техническая задача.

Настоящее изобретение предназначено для решения проблем стандартного раствора для роста волос, и таким образом, технической задачей настоящего изобретения является обеспечение вещества, обладающего превосходными физиологическими свойствами, такими как устойчивость к воде, при этом обладающего такими же или лучшими функциями предотвращения выпадения волос и/или стимулирования роста волос по сравнению с обычными растворами для роста волос, такими как естественные факторы роста, пептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3, или Миноксидил.

Техническое решение.

Для достижения вышеуказанной цели настоящее изобретение относится к соединению, имеющему структуру, в которой Миноксидил и пептид химически связаны.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может состоять из 2-30, предпочтительно 5-20, более предпочтительно 8-15 и более предпочтительно 10-12 аминокислотных последовательностей, но не ограничивается этим.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения пептид предпочтительно является водорастворимым пептидом, но не ограничивается этим. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения водорастворимый пептид предпочтительно имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофильные боковые цепи, не менее чем 50%, предпочтительно не менее чем 60%, более предпочтительно не менее чем 70%, более предпочтительно не менее чем 80%, более предпочтительно не менее чем 90% и наиболее предпочтительно 100%. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения водорастворимый пептид предпочтительно содержит не более чем 5 аминокислот, которые содержат гидрофобные боковые цепи, предпочтительно не более чем 4 аминокислоты, более предпочтительно не более чем 3 аминокислоты, более предпочтительно не более чем 2 аминокислоты, более предпочтительно не более чем 1 аминокислоту и наиболее предпочтительно не содержит никакой аминокислоты.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может представлять собой, но не ограничивается этим, пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; пептид Keramin2, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; или пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, содержащей любое одно из соединений, раскрытых выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к косметической композиции для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, содержащую любое одно из соединений, раскрытых выше.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения косметическая композиция может представлять собой, но не ограничивается этим, композиции, такие как смягчающий косметический лосьон, питательный косметический лосьон, питательные кремы, массажные кремы, эссенции, кремы для глаз, очищающие кремы, очищающие пены, воду для снятия макияжа, обертывания, спрей, порошки, тоник для волос, кремы для волос, лосьоны для волос, шампунь для волос, ополаскиватели для волос, кондиционеры для волос, спрей для волос, аэрозоль для волос, помады, золь-гель, эмульсии, масла, воски или аэрозоль.

Полезные эффекты.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением, которые имеют структуру, в которой Миноксидил и пептид химически связаны, обладают превосходной физиологической активностью, такой как уменьшение выпадения волос, стимуляция роста волос и стимуляция роста клеток, а также обладают превосходной стабильностью в воде и скоростью проникновения через кожу и, следовательно, могут быть полезны в качестве композиции для уменьшения выпадения волос и стимулирования роста волос.

Однако эффекты настоящего изобретения не ограничиваются вышеперечисленными эффектами, и другие эффекты, не указанные выше, могут очевидны для специалистов в данной области техники из следующего описания.

### Описание чертежей

Фиг. 1 представляет фотографию, показывающую растворимость в воде соединения по настоящему изобретению и Миноксидила.

Фиг. 2 представляет график, показывающий степень клеточной пролиферации эндотелиальных кле-

ток пупочной вены человека (HUVEC) при лечении соединением по настоящему изобретению.

Фиг. 3 представляет график, показывающий степень клеточной пролиферации клеток дермальной папиллы волос человека (HNDPC) при лечении соединением по настоящему изобретению.

Фиг. 4-6 показывают результаты подтверждения количества мРНК VEGF и TGFβ1 при лечении соединением по настоящему изобретению.

Фиг. 7 показывает результат подтверждения количества белка VEGF при лечении соединением по настоящему изобретению.

Фиг. 8 и 9 представляют изображения, показывающие степень образования кровеносных сосудов при лечении соединением по настоящему изобретению.

Фиг. 10 и 11 показывают результаты подтверждения эффекта соединения по настоящему изобретению на транслокацию β-катенина в ядро, который является сигнальным путем WNT.

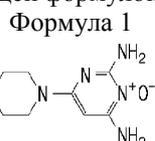
Фиг. 12 и 13 показывают результаты подтверждения того, ингибирует ли соединение по настоящему изобретению сигнальный путь BMP, который является основным фактором выпадения волос, путем ингибирования активации фосфо-Smad1/5/8 (миграция из цитоплазмы в ядро).

Фиг. 14 и 15 представляют результаты подтверждения степени роста волос при лечении соединением по настоящему изобретению.

Наилучший вариант.

Для достижения вышеуказанной цели настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру, в которой Миноксидил и пептид химически связаны.

Миноксидил представляет собой 6-амино-1,2-дигидро-1-гидрокси-2-имино-4-феноксипиримидин, имеющий структуру, представленную следующей формулой 1:



Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

Термин "пептид" в контексте настоящей заявки относится к линейной молекуле, образованной аминокислотными остатками, соединенными вместе пептидной связью. Пептид можно получить в соответствии с общепринятыми способами биологического или химического синтеза, известными в данной области, в частности методами твердофазного синтеза. (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc, 85:2149-54(1963)).

Пептид предназначен для повышения водорастворимости Миноксидила. В этом отношении пептид предпочтительно является водорастворимым пептидом, но не ограничивается этим. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептид состоит из 2-30, предпочтительно 5-20, более предпочтительно 8-15 и более предпочтительно 10-12 аминокислотных последовательностей. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения пептид предпочтительно имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофильные боковые цепи, не менее чем 50%, предпочтительно не менее чем 60%, более предпочтительно не менее чем 70%, более предпочтительно не менее чем 80%, более предпочтительно не менее чем 90% и наиболее предпочтительно 100%. С другой стороны, пептид имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофобную боковую цепь, менее чем 50%, предпочтительно не более чем 40%, более предпочтительно не более чем 30%, более предпочтительно не более чем 20%, более предпочтительно не более чем 10% и наиболее предпочтительно 0%. Термин "аминокислота, содержащая гидрофильную боковую цепь" в контексте настоящей заявки относится к аргинину (Arg), гистидину (His), лизину (Lys), аспарагиновой кислоте (Asp), глутаминовой кислоте (Glu), серину (Ser), треонину (Thr), аспарагину (Asn), глутамину (Gln), цистеину (Cys), селеноцистеину (Sec), глицину (Gly) и пролину (Pro), и термин "аминокислота, содержащая гидрофобную боковую цепь" относится к аланину (Ala), валину (Val), изолейцину (Ile), лейцину (Leu), метионину (Met), фенилаланину (Phe), тирозину (Tyr) и триптофану (Trp), но не ограничивается этим, и в дополнение к вышеуказанным аминокислотам, присутствующим в природе, их модифицированные продукты и т.п. также можно использовать без ограничения. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения аминокислота, содержащая гидрофобную боковую цепь, присутствует в пептиде в количестве не более чем 5, предпочтительно не более чем 4, более предпочтительно не более чем 3, более предпочтительно не более чем 2, более предпочтительно не более чем 1 и наиболее предпочтительно 0. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептид предпочтительно представляет собой, но не ограничивается этим, пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; пептид Keramin2, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению обладает способностью стимулировать клеточный рост, что касается эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток дермальной папиллы волос человека (HNDPC). В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению обладает функцией активации пути сигнальной трансдукции WNT. В соответствии с дру-

гим вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению переносит  $\beta$ -катенин в ядро. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению блокирует сигнальный путь BMP, который является основным фактором выпадения волос.

Соединение по настоящему изобретению имеет превосходную стабильность как таковое, но стабильность может быть дополнительно улучшена путем модификации любой аминокислоты, составляющей пептид, связанный с соединением. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения N-конец пептида может связываться с защитной группой, выбранной из группы, состоящей из ацетильной группы, флуоренилметоксикарбонильной группы, формильной группы, пальмитоильной группы, миристильной группы, стеарильной группы и полиэтиленгликоля (ПЭГ), и, таким образом, стабильность может быть дополнительно улучшена. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может связываться с защитной группой, выбранной из группы, состоящей из ацетильной группы, флуоренилметоксикарбонильной группы, формильной группы, пальмитоильной группы, миристильной группы, стеарильной группы и полиэтиленгликоля (ПЭГ), и таким образом стабильность может быть дополнительно улучшена.

Модификации аминокислот, как описано выше, играют важную роль в значительном улучшении стабильности соединений по настоящему изобретению. Термин "стабильность" в контексте настоящей заявки предназначен для охвата стабильности "in vitro", а также стабильности "in vivo", такой как стабильность при хранении (например, стабильность при хранении при комнатной температуре). Кроме того, вышеуказанная защитная группа играет роль защиты соединения по настоящему изобретению от воздействия протеазы in vivo и in vitro.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивают композицию для лечения или уменьшения интенсивности выпадения волос, включающую соединение в качестве эффективного компонента. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает композицию для улучшения состояния кожи, включающую пептид в качестве эффективного компонента. В настоящем изобретении композиция может быть в форме фармацевтической композиции или продукта лечебного питания, но не ограничивается этим.

Поскольку композиция по настоящему изобретению включает вышеуказанное соединение по настоящему изобретению в качестве эффективного компонента, содержание, общее для них обоих, не включено во избежание чрезмерной сложности настоящего описания.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения лечение или уменьшение интенсивности выпадения волос при помощи соединений по настоящему изобретению представляет собой стимуляцию роста волос или генерацию волос. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению обладает способностью стимулировать рост клеток HUVES и HNDPC и стимулирует путь передачи сигналов  $\beta$ -катенина, типичный путь сигнальной трансдукции белка WINT. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению блокирует сигнальный путь BMP, который является основным фактором выпадения волос. Эксперименты на животных, основанные на этих результатах, показали, что соединение по настоящему изобретению значительно способствовало росту волос. Поэтому композиция по настоящему изобретению очень эффективна для улучшения роста волос и состояния кожи.

Также в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения улучшения состояния кожи при помощи соединения по настоящему изобретению представляют собой уменьшение морщин, улучшение эластичности кожи, предотвращение старения кожи, улучшение увлажнения кожи, лечение ран или регенерацию кожи.

Поскольку композиция по настоящему изобретению включает вышеуказанное соединение по настоящему изобретению в качестве эффективного компонента, содержание, общее для них обоих, не включено во избежание чрезмерной сложности настоящего описания.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, включающую (а) фармацевтически эффективное количество вышеуказанного соединения по настоящему изобретению и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтически эффективное количество" в контексте настоящей заявки относится к количеству, достаточному для достижения эффективности или активности соединения по настоящему изобретению, описанного выше.

Фармацевтически приемлемые носители, содержащиеся в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают носители, которые обычно используют для получения препаратов, и включают например, но не ограничиваются этим, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральные масла и т.п. Фармацевтическая композиция по

настоящему изобретению может дополнительно включать смазывающие вещества, увлажнители, подсластители, ароматизаторы, эмульгатор, суспендирующие средства, консерванты и т.п. в дополнение к вышеуказанным компонентам. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и композиции подробно описаны в Корейской выложенной патентной публикации № 2017-0027312.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получить путем формулирования в виде стандартной лекарственной формы или путем включения в многодозовый контейнер с использованием фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, в соответствии со способом, который может быть легко осуществлен специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. В этом случае композиции могут быть в форме растворов, суспензий или эмульсий в масляной или водной среде или могут быть в форме экстрактов, порошков, гранул, таблеток, капсул или гелей (например, гидрогелей) и дополнительно могут включать диспергирующие средства или стабилизаторы.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить перорально или парентерально во время клинического применения и можно использовать в форме общего фармацевтического препарата. То есть фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить перорально или парентерально в виде различных медицинских препаратов во время действительно медицинского применения, и при формулировании фармацевтической композиции по настоящему изобретению ее получают с использованием разбавителей или эксципиентов, таких как наполнители, сухие разбавители, связующие, увлажнители, разрыхлители и поверхностно-активные вещества, которые обычно используют. Твердые лекарственные формы для перорального введения могут включать таблетки, пилюли, порошки, гранулы или капсулы, и твердые композиции можно получить путем смешивания растительного экстракта или ферментированного растительного экстракта с одним или несколькими эксципиентами, такими как крахмал, карбонат кальция, сахароза, лактоза или желатин. В дополнение к простым эксципиентам также используют такие смазывающие вещества, как стеарат магния и тальк. Жидкие лекарственные формы для перорального введения, включающие суспензию, жидкости для внутреннего применения, эмульсию, сироп и т.п., могут включать простые разбавители, такие как вода или жидкий парафин, а также различные эксципиенты, такие как увлажнители, подсластители, ароматизаторы или консерванты. Композиции для парентерального введения могут включать стерилизованный водный раствор, неводный растворитель, суспендирующее средство, эмульсию, лиофилизирующий агент или суппозиторий. Неводный растворитель и суспензия могут представлять собой пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, сложный эфир для инъекций, такой как этилолеат. Основой суппозитория может быть витепсол, макрогол, твин 61, масло какао, лауриновое масло, глицерин, желатин и т.п.

Единицы дозирования могут содержать, например, 1-, 2-, 3- или 4-кратную единичную дозу или 1/2, 1/3 или 1/4 единичной дозы. Единичная доза должна содержать количество активного лекарственного средства, которое вводится в виде однократной дозы, и обычно соответствует всей дозе, половине, одной трети или одной четверти суточной дозы.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получить путем формулирования в виде стандартной лекарственной формы или путем включения в многодозовый контейнер с использованием фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов в соответствии со способом, который может быть легко осуществлен специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. В этом случае композиции могут быть в форме растворов, суспензий или эмульсий в масляной или водной среде или могут они быть в форме экстрактов, порошков, гранул, таблеток, капсул или гелей (например, гидрогелей) и дополнительно могут включать диспергирующие средства или стабилизаторы.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению представляет собой косметическую композицию, включающую (а) косметически эффективное количество соединения по настоящему изобретению, описанного выше; и (b) косметически приемлемый носитель.

Термин "косметически эффективное количество" в контексте настоящей заявки относится к количеству композиции по настоящему изобретению, описанной выше, достаточному для достижения эффекта, улучшающего состояние кожи.

Косметические композиции по настоящему изобретению можно получить в виде любого препарата, обычно производимого в данной области техники, например, включая, но не ограничиваясь этим, растворы, суспензии, эмульсии, пасты, гели, кремы, лосьоны, порошки, мыла, содержащие поверхностно-активные вещества очищающие средства, масла, порошковые основы, эмульсионные основы, восковые основы и аэрозоли. Более конкретно косметические композиции по настоящему изобретению можно получить в различных формах, например в виде растворов, золь-гелей, эмульсий, масел, восков, аэрозолей и т.п., таких как, но не ограничиваясь этим, смягчающий косметический лосьон, питательный косметический лосьон, питательные кремы, массажные кремы, эссенции, кремы для глаз, очищающие кремы, очищающие пены, вода для снятия макияжа, обертывания, спреи, порошки, тоник для волос, кремы для волос, лосьоны для волос, шампунь для волос, ополаскиватели для волос, кондиционеры для волос, спреи для волос, аэрозоли для волос, помады и гели.

Композиции в виде пасты, крема или геля по настоящему изобретению могут включать животные масла, растительные масла, воски, парафин, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоль, кремний, бентонит, диоксид кремния, тальк или цинк в качестве компонента-носителя.

Композиции в виде порошка или спрея по настоящему изобретению могут включать лактозу, тальк, диоксид кремния, гидроксид алюминия, силикат кальция или полиамидный порошок в качестве компонента-носителя, и, в частности, композиция в виде спрея может дополнительно включать, но не ограничивается этим, пропелленты, такие как хлорфторуглерод, пропан/бутан или диметиловый эфир.

Композиции в виде раствора или эмульсии по настоящему изобретению могут включать, но не ограничиваются этим, растворители, солюбилизующие средства или эмульгаторы в качестве компонента-носителя, такие как вода, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутилглицеролевое масло, алифатический сложный эфир глицерина, полиэтиленгликоль или сложный эфир сорбитана и жирной кислоты.

Композиция в виде суспензии по настоящему изобретению может включать, но не ограничивается этим, разбавители в жидкой фазе, такие как вода, этанол и пропиленгликоль, суспендирующие средства, такие как этоксилированный изостеариловый спирт, сложный эфир полиоксиэтиленсорбита и сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксид алюминия, бентонит, агар и трагакант, в качестве компонента-носителя.

Если композиция по настоящему изобретению представляет собой очищающее средство, содержащее поверхностно-активное вещество, композиция может включать сульфат алифатического спирта, сульфат эфира алифатического спирта, моноэфир сульфосукциновой кислоты, изетионат, производные имидазолия, метилтаурат, саркозинат, эфирсульфат амида жирной кислоты, алкиламидобетаин, алифатические спирты, глицерид жирной кислоты, диэтаноламид жирной кислоты, растительные масла, производные ланолина или этоксилированный глицериновый сложный эфир жирной кислоты в качестве компонента-носителя, но не ограничивается этим.

Если композиция по настоящему изобретению представляет собой шампунь для волос, базовые компоненты для образования шампуня для волос, такие как загустители, поверхностно-активные вещества, регуляторы вязкости, увлажнители, регуляторы pH, антисептики, эфирные масла и т.д., смешивают с соединением по настоящему изобретению. CDE можно использовать в качестве загустителя, поверхностно-активное вещество может представлять собой LES, которое является анионным поверхностно-активным веществом, и кокобетаин, который является амфотерным поверхностно-активным веществом, агент, регулирующий вязкость, может представлять собой Polyquater, увлажнитель может представлять собой глицерин, агент, регулирующий pH, может представлять собой лимонную кислоту или гидроксид натрия, и консервант может представлять собой экстракт грейпфрута. Кроме того, можно добавить эфирные масла, такие как масло кедрового дерева, мяты перечной и розмарина, а также аминокислоты шелка, пентанол и витамин E. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения шампунь для волос может включать, но не ограничивается этим, 5-10 мас.ч. CDE, 30-40 мас.ч. LES, 10-20 мас.ч. кокобетаина, 0,1-0,2 мас.ч. Polyquater, 5-10 мас.ч. глицерина, 0,1-1,01 мас.ч. экстракта грейпфрута, 0,5-1 мас.ч. аминокислоты шелка, 0,5-1 мас.ч. пентанола, 0,5-2 мас.ч. витамина E и 0,01-0,1 мас.ч. любого из масел кедрового дерева, мяты перечной и розмарина в качестве эфирного масла в расчете на 100 мас.ч. соединения по настоящему изобретению.

Компоненты, включенные в косметическую композицию по настоящему изобретению, могут включать в дополнение к соединению по настоящему изобретению в качестве эффективного компонента и компонентам-носителям компоненты, обычно используемые в косметических композициях, и могут включать, но не ограничиваются этим, обычные адьюванты, такие как антиоксиданты, стабилизаторы, солюбилизаторы, витамины, пигменты и ароматизаторы.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, включающий стадию чрескожного введения соединения на участке поражения у субъекта, страдающего от выпадения волос.

Чрескожное введение может представлять собой, но не ограничивается этим, распыление по поверхности или инъекцию.

Участок поражения может включать, но не ограничивается этим, по меньшей мере одну область, выбранную из группы, состоящей из кожи головы, лица, бороды, головы, усов, тела, бровей и век.

Субъектом, страдающим от выпадения волос, может быть пациент, страдающий каким-либо расстройством выпадения волос, выбранным из группы, состоящей из андрогенной алопеции, очаговой алопеции, системной алопеции, дегенеративной алопеции, трихотилломании, телогеновой алопеции, анагеновой алопеции, алопеции cicatrisata, рубцовой алопеции, тонкой кожи головы, дистрофии стержня волоса, инфекционных заболеваний волос, генетических заболеваний и химиотерапии, гормонального дисбаланса, грибковой инфекции и алопеции, вызванной приемом лекарств.

Далее настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на примеры и экспериментальные примеры.

Однако следующие примеры и экспериментальные примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения, и содержание настоящего изобретения не ограничивается следующими

примерами и экспериментальными примерами.

Пример 1. Синтез и оценка растворимости соединения по настоящему изобретению.

1-1. Синтез пептида.

1-1-1. Синтез пептида SEQ ID NO: 3.

700 мг хлортритилхлоридной смолы (CTL смола, Nova biochem [0064] кат. № 01-64-0021) помещали в реакционный сосуд и к этой смеси добавляли 10 мл метилхлорида (MC) с последующим перемешиванием в течение 3 мин. Раствор удаляли и к этой смеси добавляли 10 мл диметилформамида (DMF). После перемешивания в течение 3 мин растворитель снова удаляли. В реактор добавляли 10 мл раствора дихлорметана и затем добавляли 200 ммоль Fmoc-Cys(trt)-OH (Bachem, Swiss) и 400 ммоль диизопропилэтиламина (DIEA), перемешивали и, таким образом, хорошо растворяли и подвергали взаимодействию при перемешивании в течение 1 ч. После завершения реакции осуществляли промывку и метанол и DIEA (2:1) растворяли в дихлорметане (DCM), подвергали взаимодействию в течение 10 мин и промывали избытком DCM/DMF (1:1). Этот раствор удаляли и к смеси добавляли 10 мл диметилформамида (DMF). После перемешивания в течение 3 мин растворитель удаляли снова. В реакционный сосуд добавляли 10 мл раствора для снятия защиты (20% пиперидин/DMF), перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре и затем этот раствор удаляли. Добавляли такое же количество раствора для снятия защиты и взаимодействие поддерживали в течение 10 мин. Затем этот раствор удаляли и промывали два раза при помощи DMF, один раз при помощи MC и один раз при помощи DMF, каждый в течение 3 мин, с получением смолы Cys(trt)-CTL.

В новый реактор добавляли 10 мл раствора DMF, добавляли 200 ммоль Fmoc-His(trt)-OH (Bachem, Swiss), 200 ммоль HoBt и 200 ммоль Bop, перемешивали и хорошо растворяли. В реактор добавляли 400 ммоль DIEA двумя порциями и затем перемешивали в течение по меньшей мере 5 мин, пока все твердые вещества не растворялись. Раствор с растворенной смесью аминокислот помещали в реакционный сосуд, содержащий смолу, из которой были удалены защитные группы, и оставляли для взаимодействия в течение 1 ч при комнатной температуре при перемешивании. Реакционный раствор удаляли и перемешивали с раствором DMF три раза по 5 мин каждый, а затем удаляли. Брали небольшое количество реакционной смолы и степень протекания реакции контролировали при помощи теста Кайзера. (Нингидриновый тест). Смолу His(trt)-Cys(trt)-CTL получали путем удаления защиты два раза таким же образом, как описано выше, с использованием раствора для удаления защиты. После тщательной промывки при помощи DMF и MC и снова используя тест Кайзера осуществляли следующий эксперимент адгезии аминокислот, как описано выше.

На основании выбранной аминокислотной последовательности осуществляли цепные реакции в следующем порядке Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Arg, Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Val, Fmoc-Arg, Fmoc-Thr, Fmoc-Gln(trt) и Fmoc-Arg(pbf). Fmoc-защитную группу удаляли путем взаимодействия с раствором для удаления защиты дважды в течение 10 мин и затем тщательно промывали. Добавляли уксусный ангидрид, DIEA и HoBt и ацетилирование осуществляли в течение 1 ч, и затем полученную таким образом пептидильную смолу промывали три раза, каждый с использованием DMF, MC и метанола. Медленно продували азотом и сушили, и затем тщательно сушили путем снижения давления под вакуумом в атмосфере P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Затем после добавления 30 мл удаляемого раствора [95% трифторуксусной кислоты, 2,5% дистиллированной воды, 2,5% тиоанизола] взаимодействие поддерживали в течение 2 ч, иногда встряхивая, при комнатной температуре. Смолу фильтровали и промывали небольшим количеством раствора TFA и затем объединяли с маточным раствором. Дистилляцию осуществляли при пониженном давлении таким образом, чтобы общий остаточный объем составлял примерно половину, и добавляли 50 мл холодного эфира, чтобы вызвать осаждение. Осажденные вещества собирали центрифугированием и два раза промывали холодным эфиром. Маточный раствор удаляли и тщательно сушили под азотом с получением 0,65 г неочищенного пептида NH<sub>2</sub>-Arg-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH (SEQ ID NO: 3) (выход: 92,6%). Молекулярная масса 1287,1 (теоретическое значение: 1286,5) была получена при измерении с использованием анализатора молекулярной массы.

1-1-2. Синтез пептидов SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Пептид (Glu-Leu-Ile-Glu-His-Gly-Gly-Gly-Arg-Pro-Ala-Asp: ELIEHGGGRPAD) SEQ ID NO: 1 и пептид (Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His: Ac-YKSKKGGWTH) SEQ ID NO: 2 синтезировали с использованием способа, аналогичного описанному в примере 1-1-1.

Таблица 1

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	Аналитическое значение (масс-спектрометр)	
		Аналитическое значение	Теоретическое значение
1	ELIEHGGGRPAD	1250,9	1250,35
2	Ac-YKSKKGGWTH	1233,8	1233,4
3	RQTRVERCHC	1287,1	1286,5

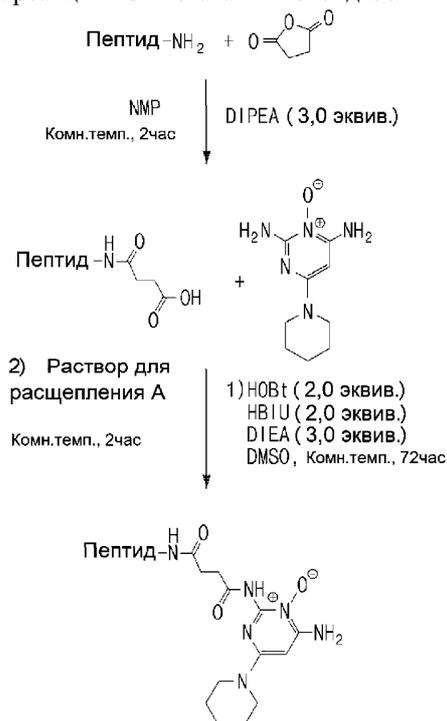
1-2. Синтез соединения по настоящему изобретению.

Пептидильную смолу (1 ммоль) и 3,9 г (3 ммоль, 3,0 экв.) N,N'-диизопропилэтиламина (DIPEA) в реакторе для синтеза пептидов растворяли в 10 мл 1-метил-2-пирролидинона (NMP) и затем добавляли

200 мг (2 ммоль, 2,0 экв.) янтарного ангидрида и подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель отфильтровывали и промывали свежим NMP (5 мл×2) с получением конъюгата пептидильная смола-янтарная кислота. 270 мг (0,2 ммоль, 2,0 экв.) 1-гидроксизензотриазола (HOBt) и 759 мг (0,2 ммоль, 2,0 экв.) N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)урионий гексафторфосфата (HBTU) растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (DMSO) и подвергали взаимодействию в течение 30 мин. Добавляли 388 мг (0,3 ммоль, 3 экв.) N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA), 41,8 мг (0,2 мМ) аналога Миноксидила и конъюгата пептидильная смола-янтарная кислота (0,1 ммоль) и подвергали взаимодействию при комнатной температуре в течение 72 ч и фильтровали с получением прореагировавшей пептидильной смолы. Полученную смолу подвергали взаимодействию с раствором для расщепления при комнатной температуре в течение 2 ч для удаления смолы и защитной группы и кристаллизовали с использованием 10 мл (10 ммоль) диэтилового эфира с получением гибридного пептида с Миноксидилом.

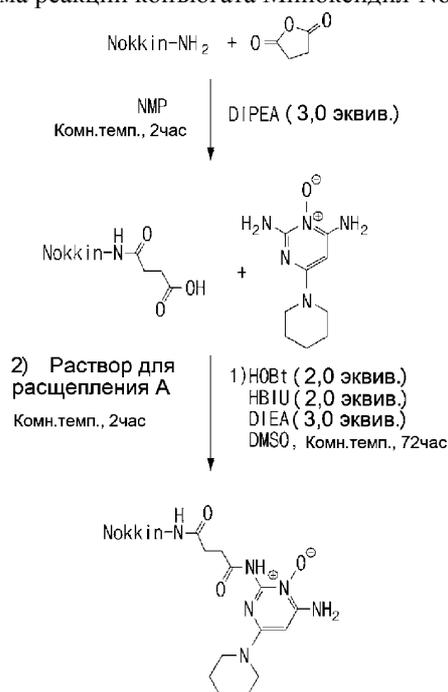
### Схема реакции 1

Схема реакции конъюгата Миноксидила и пептида



### Схема реакции 2

Схема реакции конъюгата Миноксидил-Nokkin



**Схема реакции 3**

Схема реакции конъюгата Миноксидил-Керамин2

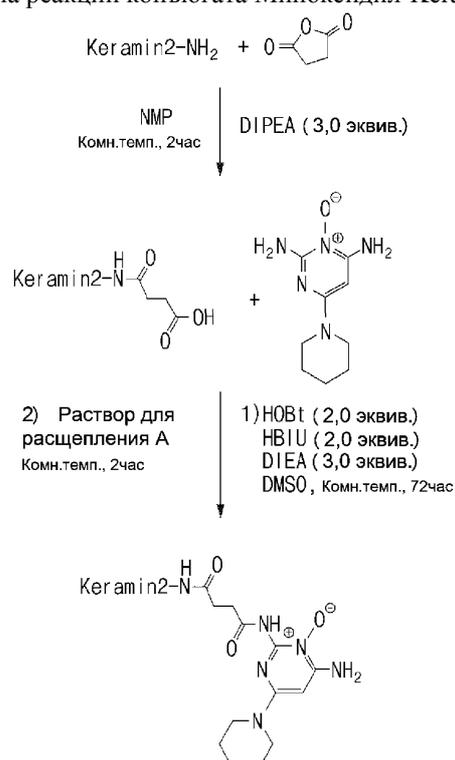
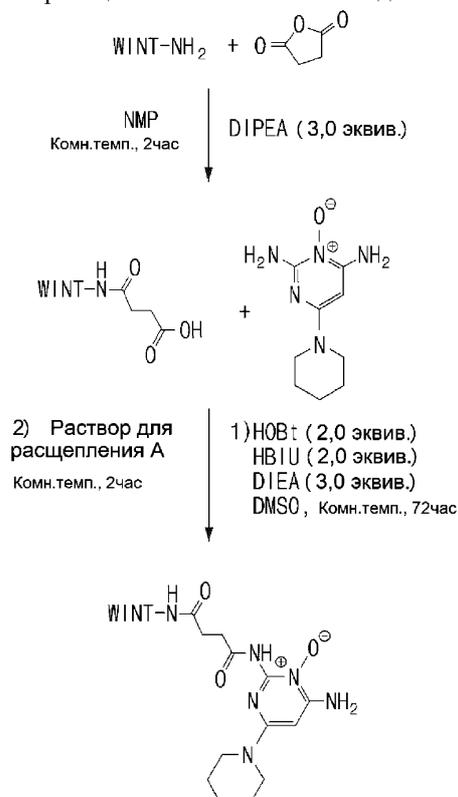
**Схема реакции 4**

Схема реакции конъюгата Миноксидил-WINT



## 1-3. Оценка растворимости.

Миноксидил-CG-Nokkin, Миноксидил-CG-Keramin2 и Миноксидил-CG-WINT, полученные в примере 1-1, растворяли в DW при концентрации 10 мг/мл соответственно. Миноксидил использовали в качестве контроля.

В результате подтверждали, что Миноксидил был почти не растворим в воде при той же концентрации и, таким образом, находился в непрозрачном состоянии, тогда как все три соединения по настоящему изобретению полностью растворились в воде (см. фиг. 1).

Пример 2. Оценка степени клеточной пролиферации при обработке соединением по настоящему изобретению.

2-1. Оценка клеточной пролиферации для эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC).

Для подтверждения функции соединения по настоящему изобретению, синтезированного в примере 1, HUVEC обрабатывали соединением по настоящему изобретению для подтверждения степени пролиферации. 3000 HUVEC помещали в каждую лунку 96-луночного планшета и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 24 ч. Через 24 ч среду заменяли бессывороточной средой DMEM и три соединения по настоящему изобретению, синтезированные в примере 1, и Миноксидил добавляли к клеткам в концентрациях 0,5, 5 и 50 мкМ соответственно и инкубировали в течение 72 ч. После завершения инкубации супернатант удаляли, клетки фиксировали с использованием этанола и промывали три раза при помощи PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор). После удаления промывочного раствора клетки обрабатывали колориметрическим раствором SRB и тщательно промывали 1%-й уксусной кислотой. После этого клетки наблюдали под микроскопом для наблюдения за жизнеспособностью клеток. К окрашенным клеткам добавляли 10 мМ раствора основания Trizma (pH 10,5) для элюирования SRB, а затем измеряли поглощение при помощи ультрафиолетового света с длиной волны 560 нм для измерения жизнеспособности клеток.

В результате было подтверждено, что в случае трех соединений по настоящему изобретению при низкой концентрации пролиферация клеток, как было показано, аналогична пролиферации контрольной группы, обработанной Миноксидилом, но степень пролиферации клеток заметно возрастала по сравнению с Миноксидилом при увеличении концентрации (см. фиг. 2).

2-2. Оценка клеточной пролиферации для клеток дермальной папиллы волос человека (HNDPC).

3000 HNDPC помещали в каждую лунку 96-луночного планшета и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 24 ч. Среду заменяли бессывороточной средой DMEM и три соединения по настоящему изобретению и Миноксидил добавляли в концентрациях 0,5, 5 и 50 мкМ соответственно и инкубировали в течение 72 ч. После завершения инкубации клетки окрашивали таким же образом, как в примере 2-1, и SRB элюировали для количественной оценки степени пролиферации клеток.

В результате было подтверждено, что три соединения по настоящему изобретению показали более высокую степень пролиферации клеток по сравнению с Миноксидилом, и степень пролиферации клеток значительно возрастала пропорционально концентрации обрабатываемого средства (см. фиг. 3).

Пример 3. Оценка эффекта соединения по настоящему изобретению на экспрессию VEGF и TGFβ1.

Поскольку VEGF играет роль в ангиогенезе и функции роста, а TGFβ1 влияет на выпадение волос, уровень экспрессии VEGF и TGFβ1 был подтвержден при обработке соединением по настоящему изобретению.

3-1. Оценка количества мРНК (уровень транскрипции).

VEGF экспрессировали при помощи HUVEC, а TGFβ1 экспрессировали при помощи клеток дермальных сосочков волосных фолликулов. Две клетки помещали в каждый 6-луночный планшет при плотности 1×10<sup>5</sup> клеток/лунка. После 24 ч инкубации в CO<sub>2</sub> инкубаторе среду заменяли бессывороточной средой DMEM. К клеткам добавляли три соединения по настоящему изобретению и Миноксидил при концентрации 5 и 50 мкМ соответственно и инкубировали в течение 24 ч. После сбора инкубированных клеток РНК экстрагировали с использованием набора для экстракции РНК и осуществляли RT-PCR для подтверждения степени экспрессии VEGF и TGFβ1. Праймеры, использованные в RT-PCR, показаны в табл. 2.

Таблица 2

Вид праймера	Последовательность	SEQ ID NO
VEGF прямой	(5') CCATGAACCTTCTGCTGTCTT (3')	4
VEGF обратный	(5') TCGATCGTTCTGTATCAGTCT (3')	5
TGFβ1 прямой	(5') GCCCTGGATACCAACTATTGC (3')	6
TGFβ1 обратный	(5') TCAGCACTTGCAGGAGTAGCG (3')	7
GAPDH прямой	(5') GGAGCCAAAAGGGTCATCAT (3')	8
GAPDH обратный	(5') GTGATGGCATGGACTGTGGT (3')	9

В результате три соединения по настоящему изобретению показали более высокую экспрессию VEGF, чем при обработке Миноксидилом, и, в частности, экспрессии VEGF в случае Миноксидила-Nokkin и Миноксидил-Keratin2 были значительно выше, чем в случае Миноксидила (см. фиг. 4-6). Кроме того, экспрессии TGFβ1 в случае трех соединений по настоящему изобретению были ниже по сравнению с Миноксидилом, и, в частности, уровень экспрессии TGFβ1 в случае Миноксидила-Nokkin был значительно ниже, чем в случае Миноксидила при такой же концентрации (см. фиг. 4-6). Из этих результатов видно, что, поскольку три соединения по настоящему изобретению имеют высокий уровень экспрессии VEGF, который играет роль в ангиогенезе и функции роста, и имеют низкий уровень экспрессии TGFβ1, который участвует в выпадении волос, три соединения по настоящему изобретению можно ис-

пользовать для предотвращения выпадения волос или улучшения.

3-2. Оценка количества белка (уровень трансляции).

HUVEC помещали в каждую лунку 6-луночного планшета при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунка. Инкубацию осуществляли в  $\text{CO}_2$  инкубаторе в течение 24 ч. После замены среды бессывороточной средой DMEM три соединения по настоящему изобретению и Миноксидил добавляли к клеткам при концентрации 5 и 50 мкМ соответственно и затем инкубировали в течение 24 ч. Белок экстрагировали с использованием набора для экстракции белка и осуществляли Вестерн-блоттинг. После получения 12% SDS-PAGE 15 мкг белка загружали на полученный SDS-PAGE и переносили на PVDF мембрану. Блокировку осуществляли 5%-м раствором снятого молока при комнатной температуре в течение 1 ч. Первичное антитело (анти-VEGF антитело, антитело против альфа-тубулина) присоединяли при концентрации 1/3000 при комнатной температуре в течение 2 ч. Осуществляли три промывки при помощи PBST в течение 10 мин и вторичное антитело присоединяли при концентрации 1/5000 при комнатной температуре в течение 1 ч. После трехкратной промывки в течение 15 мин при помощи BST осуществляли детекцию.

В результате было обнаружено, что три соединения по настоящему изобретению аналогичны Миноксидилу или превосходят Миноксидил, что касается уровня экспрессии VEGF. (см. фиг. 7). Поскольку три соединения по настоящему изобретению повышают экспрессию VEGF, которая играет роль в ангиогенезе и функции роста, соединения по настоящему изобретению могут быть полезны для предотвращения или уменьшения выпадения волос.

Пример 4. Оценка степени ангиогенеза с использованием соединения по настоящему изобретению.

200 мкл Матригеля помещали в каждую лунку 24-луночного планшета и инкубировали в течение 1 ч.  $1 \times 10^5$  HUVEC помещали в каждый Матригель. Три соединения по настоящему изобретению и Миноксидил добавляли в содержащий клетки Матригель при концентрации 5 и 50 мкМ соответственно. VEGF, используемый в качестве положительного контроля, обрабатывали при концентрации 50 и 100 нМ. Через 6 ч степень ангиогенеза HUVEC наблюдали через микроскоп.

В результате при обработке тремя соединениями по настоящему изобретению степень ангиогенеза была превосходной и, в частности, превосходила Миноксидил, и образование кровеносных сосудов происходило до степени, аналогичной той, которую наблюдали при обработке VEGF (см. фиг. 8). Когда степень ангиогенеза в каждой экспериментальной группе сравнивали относительно количества полностью сформированных кровеносных сосудов в пределах определенной единицы площади, три соединения по настоящему изобретению показали относительно хороший ангиогенез по сравнению с Миноксидилом. (см. фиг. 9).

Пример 5. Подтверждение того, участвует ли Миноксидил-WINT по настоящему изобретению в транслокации  $\beta$ -катенина, который является сигнальным путем WINT, в ядро.

Клетки дермального сосочка волосяного фолликула помещали в каждую лунку 6-луночного планшета при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунка. Инкубацию осуществляли в  $\text{CO}_2$  инкубаторе в течение 24 ч. После замены среды бессывороточной средой DMEM к клеткам добавляли Миноксидил, Миноксидил-WINT и WINT соответственно при концентрации 5 и 50 мкМ и затем инкубировали в течение 24 ч. Белок экстрагировали с использованием набора для экстракции белка (экстракция каждого ядерного/цитоплазматического белка). Вестерн-блоттинг осуществляли таким же образом, как в примере 3-2, за исключением того, что в качестве первичных антител использовали антитело против бета-катенина, антитело против HDAC, антитело против альфа-тубулина.

В результате было подтверждено, что Миноксидил-WINT, соединение по настоящему изобретению, при такой же концентрации демонстрирует транслокацию  $\beta$ -катенина в ядро, в то время как Миноксидил в отдельности имеет значительно более низкую степень транслокации  $\beta$ -катенина в ядро (см. фиг. 10). Было обнаружено, что в случае Миноксидила-WINT транслокация в ядро была по меньшей мере в 2,8 раза выше, чем при использовании Миноксидила в отдельности (см. фиг. 11). Из этих результатов видно, что поскольку Миноксидил-WINT, соединение по настоящему изобретению, может переносить  $\beta$ -катенин, который является сигнальным путем WINT, в ядро и имеет более высокую степень транслокации  $\beta$ -катенина в ядро, чем Миноксидил, соединение по настоящему изобретению, можно использовать для стимуляции роста волос или предотвращения выпадения волос.

Пример 6. Подтверждение того, участвует ли Миноксидил-Nokkin по настоящему изобретению в транслокации фосфо-Smad1/5/8, который является сигнальным путем Nokkin, в ядро.

Было подтверждено, что Миноксидил-Nokkin по настоящему изобретению ингибирует сигнальный путь BMP, который является основным фактором потери волос, путем ингибирования активации фосфо-Smad1/5/8 (миграция из цитоплазмы в ядро). Эксперимент осуществляли таким же образом, как в примере 5, за исключением того, что в присутствии BMP2 Миноксидил-Nokkin использовали вместо Миноксидил-WINT, и в качестве первичных антител использовали антитело против P-Smad1/5/8 и антитело против HDAC1.

В результате было подтверждено, что в случае обработки при помощи Миноксидил-Nokkin доставка P-Smad1/5/8 в ядро была снижена по сравнению с обработкой Миноксидилом, и по мере увеличения концентрации Миноксидил-Nokkin количество P-Smad1/5/8 в ядре еще больше уменьшалось (см. фиг. 12).

и 13). Из этих результатов видно, что поскольку Миноксидил-Nokkin по настоящему изобретению могут блокировать сигнальный путь BMP для выпадения волос, Миноксидил-Nokkin по настоящему изобретению можно использовать для стимуляции роста волос или предотвращения выпадения волос.

Пример 7. Идентификация роста волос при обработке соединением по настоящему изобретению.

Миноксидил-Nokkin по настоящему изобретению наносили 6 самцам мышей C57BL возраста 7 недель для определения степени роста волос. Волосы на спине 6 мышей C57BL возраста 7 недель удаляли при помощи крема для удаления волос. Миноксидил и Миноксидил-Nokkin добавляли к PBS при концентрациях 100 мкг/мл соответственно для получения образца. Образец наносили на кожу спины мыши равномерно один раз в день. После наблюдения за тем, росли ли волосы на коже спины мыши, были сделаны фотографии с точки, где цвет поверхности кожи на спине менялся на черный. Для гистологического исследования мышей умерщвляли, собирали кожу спины мышей, фиксировали в 4% PFA и помещали в парафин. Помещенный в парафин блок секционировали при 4 мкм, окрашивали H&E и наблюдали волосяной фолликул.

В результате было подтверждено, что при нанесении соединения по настоящему изобретению скорость роста волос была значительно выше, чем у контрольной группы, не обработанной образцом, или группы, обработанной Миноксидилом (см. фиг. 14). Когда волосяной фолликул исследовали при помощи теста H&E, было подтверждено, что в случае группы, обработанной соединением по настоящему изобретению, волосяной фолликул находился глубоко в коже, и количество волосяных фолликулов было больше по сравнению с контрольной группой или группой, обработанной Миноксидилом, и рост и развитие волосяных фолликулов продвигаются в форме, в которой корень волоса в волосяном фолликуле растет долго и вырастает на поверхности кожи (см. фиг. 15). Из приведенных выше результатов видно, что соединение по настоящему изобретению можно использовать для стимуляции роста волос или предотвращения выпадения волос.

Пример композиции.

Пример композиции 1. Смягчающий косметический лосьон.

Смягчающий косметический лосьон, включающий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющий следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычного косметического лосьона.

Таблица 3

Компонент	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	2,5
1,3-Бутиленгликоль	6
Глицерин	4
PEG 1500	1
Гиалуронат натрия	1
Полисорбат 20	0,5
Этанол	8
Антисептики, красители	в достаточном количестве
Бензофенон-9	0,05
Отдушки	Следовые количества
Очищенная вода	остальное
Всего	100

Пример композиции 2. Питательный крем.

Питательный крем, включающий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющий следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычного питательного крема.

Таблица 4

Компонент	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	2,5
Масло семян пенника лугового	3
Цетеариловый спирт	1,5
Стеариновая кислота	1,5
Глицерилстеарат	1,5
Жидкий парафин	10
Пчелиный воск	2
Полисорбат 60	0,6
Сорбитансесквиолеат	2,5
Сквалан	3
1,3-Бутиленгликоль	3
Глицерин	5
Триэтанолламин	0,5
Токоферилацетат	0,5
Антисептики, красители	в достаточном количестве
Отдушки	в достаточном количестве
Очищенная вода	Остальное
Всего	100

Пример композиции 3. Питательный косметический лосьон.

Питательный косметический лосьон, включающий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющий следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычного косметического лосьона.

Таблица 5

Компонент	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	2,5
1,3-Бутиленгликоль	4
Глицерин	4
Цетеариловый спирт	0,8
Глицерилстеарат	1
Триэтаноламин	0,13
Токоферилацетат	0,3
Жидкий парафин	5
Сквалан	3
Масло ореха макадамии	2
Полисорбат 60	1,5
Сорбитансесквиолеат	0,5
Карбоксивиниловый полимер	1
Антисептики, красители	в достаточном количестве
Отдушки	в достаточном количестве
Очищенная вода	Остальное
Всего	100

Пример композиции 4. Эссенция.

Эссенцию, включающую соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющую следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычной эссенции.

Таблица 6

Компонент	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	2,5
Глицерин	10
1,3-Бутиленгликоль	5
PEG 1500	2
Аллантоин	0,1
DL-пантенол	0,3
EDTA-2Na	0,02
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,1
Гиалуронат натрия	8
Карбоксивиниловый полимер	0,2
Триэтаноламин	0,18
Октилдодецит-16	0,4
Этанол	6
Отдушки, антисептики, красители	в достаточном количестве
Очищенная вода	Остальное
Всего	100

Пример композиции 5. Сыворотка для волос.

Сыворотку для волос, включающую соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющую следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычной сыворотки для волос.

Таблица 7

Компонент	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	1
Глицерин	10
1,3-Бутиленгликоль	5
PEG 1500	2
Аллантоин	0,1
DL-пантенол	0,3
EDTA-2Na	0,02
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,1
Гиалуронат натрия	8
Карбоксивиниловый полимер	0,2
Триэтаноламин	0,18
Октилдодецит-16	0,4
Этанол	6
Отдушки, антисептики, красители	в достаточном количестве
Очищенная вода	Остальное
Всего	100

Пример композиции 6. Тоник для волос.

Тоник для волос, включающий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1-2 выше, и имеющий следующий состав, получали в соответствии со способом получения обычного тоника для волос.

Таблица 8

Компонент	Содержание (масс. %)
Соединение по настоящему изобретению	1
Глицерин	2
1,3-Бутиленгликоль	2
PEG 1500	2
Аллантоин	0,1
DL-пантенол	0,3
EDTA-2Na	0,02
Гиалуронат натрия	8
Карбоксивиниловый полимер	0,2
Триэтанолламин	0,18
Этанол	10
Отдушки, антисептики, красители	в достаточном количестве
Очищенная вода	Остальное
Всего	100

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были проиллюстрированы в качестве примера, объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными выше. Специалистам в данной области техники будет понятно, что возможны различные модификации без отступления от объема формулы изобретения настоящего изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее структуру, в которой Миноксидил и пептид ковалентно связаны друг с другом,

причем пептид состоит из 5-20 аминокислот,

пептид представляет собой водорастворимый пептид,

водорастворимый пептид имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофильные боковые цепи, не менее чем 50%, и

аминокислоты, содержащие гидрофильные боковые цепи, выбраны из группы, состоящей из аргинина (Arg), гистидина (His), лизина (Lys), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), серина (Ser), треонина (Thr), аспарагина (Asn), глутамина (Gln), цистеина (Cys), селеноцистеина (Sec), глицина (Gly) и пролина (Pro).

2. Соединение по п.1, где пептид состоит из 8-15 аминокислот.

3. Соединение по п.1, где водорастворимый пептид имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофильные боковые цепи, не менее чем 70%.

4. Соединение по п.3, где водорастворимый пептид имеет содержание аминокислот, содержащих гидрофильные боковые цепи, не менее чем 90%.

5. Соединение по п.1, где водорастворимый пептид имеет 5 или менее аминокислот, содержащих гидрофобные боковые цепи.

6. Соединение по п.5, где водорастворимый пептид имеет 3 или менее аминокислот, содержащих гидрофобные боковые цепи.

7. Соединение по п.5, где аминокислота, содержащая гидрофобную боковую цепь, выбрана из группы, состоящей из аланина (Ala), валина (Val), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), метионина (Met), фенилаланина (Phe), тирозина (Tyr) и триптофана (Trp).

8. Соединение по п.1, где пептид выбран из группы, состоящей из пептида Nokkin, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1; пептида Keramin2, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и пептида WINT, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

9. Фармацевтическая композиция для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, содержащая соединение по любому из пп.1-8.

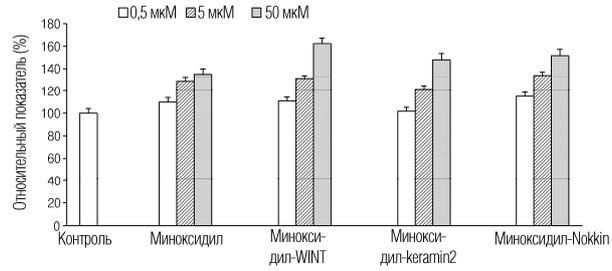
10. Косметическая композиция для предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, включающая соединение по любому из пп.1-8.

11. Косметическая композиция по п.10, где косметическая композиция представляет собой состав, выбранный из группы, состоящей из смягчающего косметического лосьона, питательного косметического лосьона, питательного крема, массажного крема, эссенции, крема для глаз, очищающего крема, очищающей пены, воды для снятия макияжа, обертывания, спрея, порошка, тоника для волос, крема для волос, лосьона для волос, шампуня для волос, ополаскивателя для волос, кондиционера для волос, спрея для волос, аэрозоля для волос, помады, золь-геля, эмульсии, масла, воска и аэрозоля.

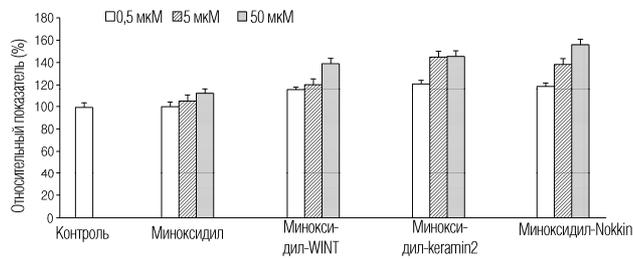
12. Способ предотвращения выпадения волос или стимуляции роста волос, включающий стадию чрескожного введения соединения по любому из пп.1-8 на участке поражения у индивидуума, страдающего выпадением волос.



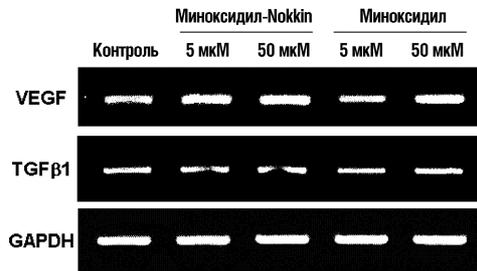
Фиг. 1



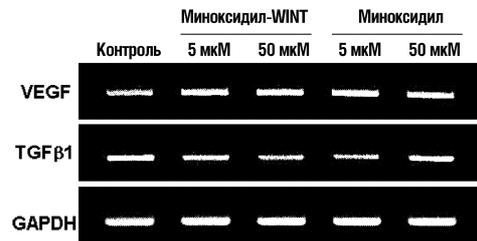
Фиг. 2



Фиг. 3



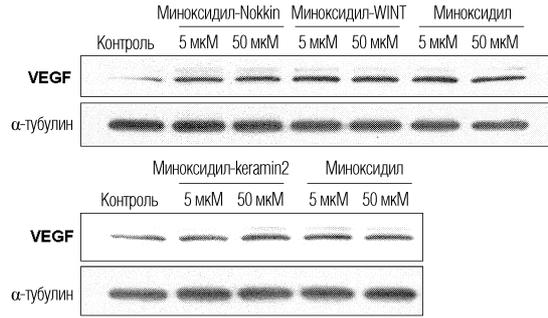
Фиг. 4



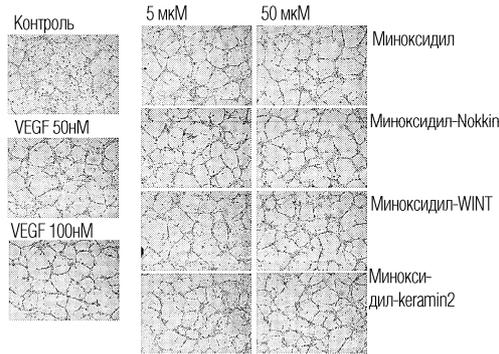
Фиг. 5



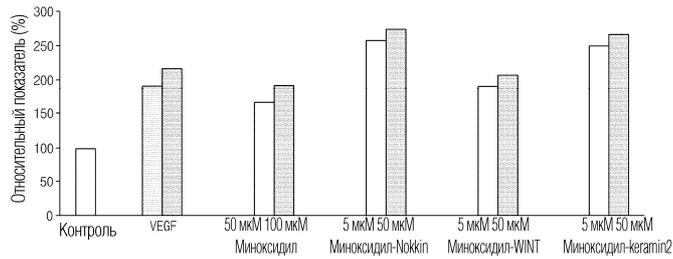
Фиг. 6



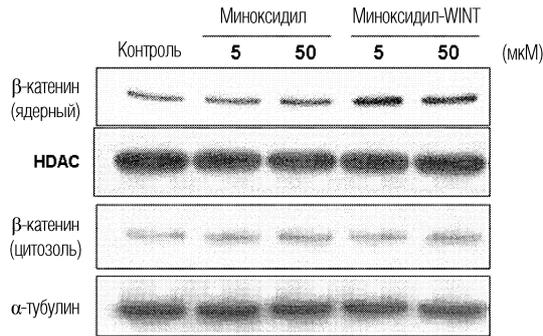
Фиг. 7



Фиг. 8



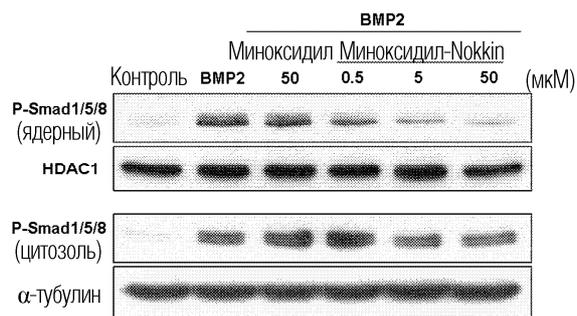
Фиг. 9



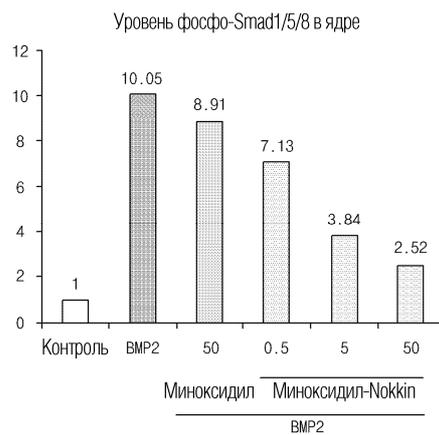
Фиг. 10



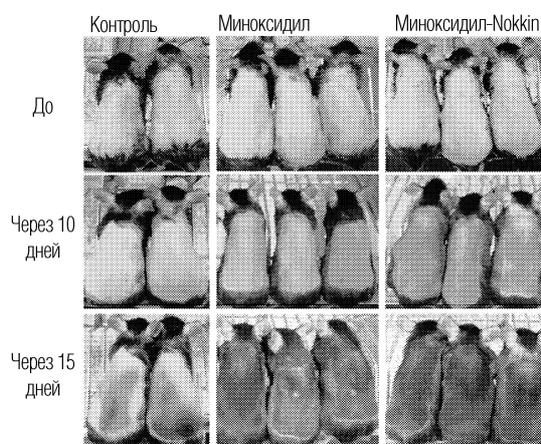
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

