

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039431**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента 2022.01.26	(51) Int. Cl. C07K 19/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01) C07J 73/00 (2006.01) A61K 31/56 (2006.01) A61K 8/63 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(21) Номер заявки 201892112	
(22) Дата подачи заявки 2016.05.20	

(54) КОНЬЮГАТ ФИНАСТЕРИДА С ПЕПТИДОМ

(31) 10-2016-0032988	(56) US-A1-20120289471
(32) 2016.03.18	JP-A-10059829
(33) KR	US-A1-20150118292
(43) 2019.03.29	KR-A-1020140041437
(86) PCT/KR2016/005405	KR-A-1020100085407
(87) WO 2017/159922 2017.09.21	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)	
(72) Изобретатель: Чунг Йонг Джи, Ким Эюн Ми (KR)	
(74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)	

(57) Изобретение относится к композиции для предотвращения потери волос и, более конкретно, к соединению, имеющему структуру, в которой финастерид и пептид являются связанными посредством ковалентной связи, и к содержащей его фармацевтической композиции или косметической композиции для предотвращения потери волос или стимуляции роста волос. Соединение по настоящему изобретению, имеющее структуру, в которой финастерид и пептид являются связанными посредством ковалентной связи, является превосходным по физиологической активности, такой как улучшение при потере волос, стимуляция роста волос, стимуляция роста клеток и т.д., является превосходным по стабильности в воде и проницаемости через кожу и, таким образом, может быть эффективно использовано в качестве композиции для предотвращения потери волос и стимуляции роста волос.

B1

039431

039431

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к соединению, имеющему структуру, конъюгирующую финастерид и пептид с помощью ковалентной связи, и к его применению для предотвращения потери волос или для стимуляции роста волос.

Уровень техники

Волосной фолликул является органом, уникальным для кожи млекопитающих. Волосной фолликул представляет собой отросток примитивного эпидермиса, распространяющийся в более глубокие слои кожи. В основании волосного фолликула расположен бугорок из клеток, известный как фолликулярный или дермальный сосочек. Этот сосочек является необходимым для нормального цикла волосного фолликула и для роста стержня волоса. Стержень волоса представляет собой нитевидную структуру, образованную из тесно соприкасающихся эпителиальных клеток, заполненных кератиновыми филаментами и белками, осуществляющими агрегацию филаментов.

Волос человека периодически повторяет цикл из фаз анагена, катагена и телогена и проходит через процесс выпадения волос и регенерации. Цикл роста волос регулируется гормонами или множеством факторов роста. Тяжелый стресс или неполноценное питание могут приближать фазы катагена и телогена, приводя к тяжелой потере волос.

Выпадение волос из кожи головы называют потерей волос. Потеря волос может быть вызвана различными факторами, включая факторы окружающей среды, такие как воздействие погоды, света или тепла и т.д., и внутренние факторы, такие как заболевания, деторождение, секреция и изменение гормонов, употребление лекарственных средств, условия питания и т.д. 5-альфа-редуктаза является основным гормоном, влияющим на механизм потери волос (выложенный патент Кореи № 10-2008-0077762). 5-альфа-редуктаза представляет собой фермент, увеличивающий салоотделение посредством превращения тестостерона, являющегося типом андрогена, в дигидротестостерон (DHT). Среди различных продуктов для предотвращения потери волос и стимуляции роста волос на рынке продуктов против потери волос существует множество продуктов, нацеленных на ингибирование эффекта 5-альфа-редуктазы. Потеря волос может быть также вызвана неполноценным питанием, сухостью кожи головы, стрессом и т.д., в дополнение к ферментативным реакциям (Eunju Ryu, et al., The Journal of Korean Society of Design Culture, 18(2), p. 89-100, 2012). В случае потери волос по этим причинам, потерю волос можно предотвращать, и рост волос можно стимулировать посредством обеспечения достаточного питания, проведения лечения кожи головы и употребления или введения антиокислительных веществ.

Независимо от ее причины, в конечном счете, потеря волос может приводить к развитию большого ментального, социального и сексуального влияния, вместе с потерей чувства собственного достоинства и самоуважения. Для лечения потери волос до настоящего времени различные вещества использовали в качестве лекарственных средств, но они имели те недостатки, что они являлись слишком дорогими, или для их эффекта показаны большие индивидуальные различия. Кроме того, в качестве косметических продуктов использовали экстракты растений, которые являются более дешевыми, но оказывают меньший эффект, но эффект являлся незначительным.

Способы лечения и решения проблемы потери волос заметно менялись на протяжении длительного периода времени. Стало возможным скрывать облысение с помощью париков, накладок и наращивания волос, но это не могло создать новые волосы. Также два доступных лекарственных средства (миноксидил и финастерид), известных до настоящего времени, могут задерживать дополнительную потерю волос, но их фактически невозможно использовать с целью индукции регенерации волосного фолликула. Также в качестве косметических продуктов для волос разработано множество продуктов для предотвращения потери волос с использованием экстрактов растений и т.д., однако трудно найти продукты, оказывающие эффект получения роста новых волос.

Различные факторы связаны вместе в прогрессировании роста и дегенерации волос. Например, существовало множество публикаций об использовании серий факторов роста для стимуляции факторов роста кератиноцитов, стимуляции активности факторов роста эндотелия сосудов и стимуляции роста волос посредством ингибирования активности белков типа BMP. Однако, несмотря на то, что для таких факторов роста показаны превосходные эффекты, дополнительный процесс повторного сворачивания и большее количество времени являются необходимыми для получения природных факторов роста, и комплексный процесс очистки для удаления источников загрязнения, происходящих из кишечной палочки, является необходимым в способе очистки. А также из-за их стабильности и высокой молекулярной массы они не могут просто преодолевать защитную оболочку волоса, и таким образом, все это, вместе с их высокой стоимостью, препятствует их использованию.

Существует также способ, который предотвращает истончение волос и делает истонченные волосы снова толстыми посредством антагонизма финастеридом против 5 α -редуктазы на основании действия финастеридом на андрогены. В качестве репрезентативного примера существует Пропеция (Merck U.S.A.), которая была одобрена по ее действию и стабильности Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) в декабре 1997 г. в качестве первого съедобного лекарственного средства против потери волос и поступила на рынок в качестве лекарственного средства против потери волос в следующем году. Финастерид представляет собой лекарственное средство, ингибирую-

шее фермент 5 α -редуктазу, который превращает тестостерон, тип андрогена, в DHT, вызывающий потерю волос. Поскольку образование DHT ингибируется посредством приема этого лекарственного средства, оно играет роль в том, чтобы сделать истонченные при облысении волосы снова толстыми и длинными. Однако у финастеридов занимает несколько месяцев проявление эффекта предотвращения потери волос. А также применительно к женщинам существует высокая вероятность возникновения врожденных дефектов плода при приеме лекарственных средств, и применительно к мужчинам существует опасность побочных эффектов, таких как потеря либидо, эректильная дисфункция, нарушение эякуляции и т.д., и напряженность из-за того, что эффект предотвращения потери волос можно поддерживать только при приеме лекарственных средств на протяжении всей жизни. Таким образом, существует множество ограничений для фактического клинического применения (выложенный патент Кореи № 10-2012-0120912).

С этой целью авторы настоящего изобретения разработали пептид Nokkin (выложенный патент Кореи № 10-2010-0085407), состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 3, пептид Kεgamin2 (выложенный патент Кореи № 10-2009-0108323), состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2, и пептид WINT (выложенный патент Кореи № 10-2011-0023991), состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 1, в качестве пептидов, которые имеют превосходящую стабильность по сравнению с природными факторами роста и могут улучшать решение проблем, вызванных большой молекулярной массой природных факторов роста, в то же время имея функции или эффекты, одинаковые или сходные с природными факторами роста. Однако обычный финастерид или пептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-3, еще нуждаются в улучшении в аспектах улучшения эффекта предотвращения потери волос и стимуляции роста волос, уменьшения побочных эффектов и улучшения растворимости в воде.

Подробное описание изобретения

Техническая задача.

Целью настоящего изобретения является уменьшение проблем, связанных с общепринятыми решениями для роста волос. Технической задачей настоящего изобретения является получение вещества для предотвращения потери волос и/или для стимуляции роста волос, которое имеет такие же или превосходящие функции по сравнению с общепринятыми решениями для роста волос, такими как природные факторы роста или пептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 1-3, или финастерид, и имеет превосходные физиологические свойства, такие как проницаемость в кожу и стабильность в воде.

Технические средства для решения технической задачи.

Для решения вышеуказанной технической задачи настоящее изобретение относится к соединению, имеющему структуру, конъюгирующую финастерид и пептид с помощью ковалентной связи.

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

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения предпочтительно пептид представляет собой растворимый в воде пептид, но не является ограниченным этим. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения растворимый в воде пептид имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно 100% аминокислот, имеющих гидрофильную боковую цепь, и, таким образом, предпочтительно является высокогидрофильным. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения аминокислота, имеющая гидрофильную боковую цепь, может представлять собой аминокислоту с электрическим зарядом, например аргинин (Arg), гистидин (His), лизин (Lys), аспарагиновую кислоту (Asp) или глутаминовую кислоту (Glu), но не является ограниченным этим. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения растворимый в воде пептид может содержать по меньшей мере 3 аминокислоты с электрическим зарядом, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот с электрическим зарядом и более предпочтительно по меньшей мере 7 аминокислот с электрическим зарядом, но не является ограниченным этим.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения растворимый в воде пептид имеет пять или менее аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь, предпочтительно четыре или менее, более предпочтительно три или менее, более предпочтительно две или менее, более предпочтительно одну или менее аминокислот и наиболее предпочтительно не имеет аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может представлять собой пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 1, пептид Kεgamin2, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2, или пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 3, но не является ограниченным этим.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтической композиции для предотвращения потери волос или стимуляции роста волос, содержащей любое из соединений, описанных выше.

Настоящее изобретение относится также к косметической композиции для предотвращения потери волос или стимуляции роста волос, содержащей любое из соединений, описанных выше.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения косметическая композиция может иметь такой состав, как смягчающий лосьон, косметическое молочко, питательный крем, массажный крем, эссенция, крем для области вокруг глаз, очищающий крем, очищающая пена, очищающая жидкость, маска, спрей, порошок, тоник для волос, крем для волос, лосьон для волос, шампунь для волос, ополаскиватель для волос, кондиционер для волос, спрей для волос, аэрозоль для волос, помада, золь-гель, эмульсия, масло, воск и аэрозоль, но не является ограниченным этим.

Благоприятный эффект.

Соединение по настоящему изобретению, имеющее структуру, конъюгирующую финастерид и пептид с помощью ковалентной связи, не только имеет превосходную физиологическую активность, такую как предотвращение потери волос, стимуляция роста волос, стимуляция роста клеток и т.д., то также имеет превосходную стабильность в воде и проницаемость через кожу, и таким образом, может быть полезным образом использовано в качестве композиции для предотвращения потери волос и стимуляции роста волос.

Краткое описание чертежей

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

Фиг. 2a и 2b представляют собой графики, показывающие эффект соединения по настоящему изобретению и финастерида на активность 5 α -редуктазы. На фиг. 2a и 2b соответственно показана относительная концентрация ДНТ и тестостерона после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 3a представляет собой фотографию после иммуноокрашивания, показывающую форму и количество кератиноцитов после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 3b представляет собой график, показывающий относительное количество кератиноцитов в соответствии с концентрацией обрабатываемого соединения.

Фиг. 4a представляет собой фотографию после иммуноокрашивания, показывающую форму и количество клеток дермального сосочка волоса (HNDPC) человека после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 4b представляет собой график, показывающий относительное количество кератиноцитов в соответствии с концентрацией обрабатываемого соединения.

Фиг. 5a представляет собой фотографию после вестерн-блоттинга, показывающую транслокацию бета-катенина в ядро клеток HNDPC после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 5b представляет собой график, переводящий это в относительные числовые значения по отношению к отрицательному контролю.

Фиг. 6a представляет собой фотографию после вестерн-блоттинга, показывающую экспрессию фосфо-Smad1/5/8 в клетках HNDPC после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 6b представляет собой график, переводящий это в относительные числовые значения по отношению к BMP2.

Фиг. 7a представляет собой фотографию после электрофореза, показывающую экспрессию мРНК DKK-1 в клетках HNDPC после обработки соединением по настоящему изобретению и финастеридом.

Фиг. 7b представляет собой график, переводящий это в относительные числовые значения по отношению к отрицательному контролю.

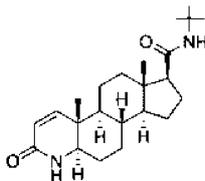
Фиг. 8a и 8b представляют собой фотографии, подтверждающие эффект соединения по настоящему изобретению на рост волос в ходе тестов на животных. Фиг. 8a сравнивает скорость роста волос у мышей после введения финастерида и соединения по настоящему изобретению, и фиг. 8b подтверждает количество волосных фолликулов по окрашиванию H&E шерсти на коже спины мышей после введения финастерида и соединения по настоящему изобретению с H&E.

Фиг. 9a и 9b представляют собой графики, показывающие результаты теста проницаемости через кожу соединения по настоящему изобретению.

Наилучший способ осуществления изобретения

Для решения технической задачи настоящее изобретение относится к соединению, имеющему структуру, конъюгирующую финастерид и пептид с помощью ковалентной связи.

Финастерид представляет собой N-(1,1-диметилэтил)-3-оксо-(5 α ,17 β)-4-азаандрост-1-ен-17-карбоксамид и имеет формулу, представленную следующей формулой 1:



По настоящему изобретению термин "пептид" обозначает линейную молекулу, сформированную посредством пептидной связи из аминокислотных остатков. Пептид можно получать биологическими способами или способами химического синтеза, в общем, известными в данной области, в частности способами твердофазного синтеза (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).

Пептид предназначен для увеличения растворимости в воде финастерида. В этом аспекте предпочтительно пептид представляет собой растворимый в воде пептид, но не является ограниченным этим. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может состоять из 2-30 аминокислот, предпочтительно 5-20 аминокислот, более предпочтительно 8-15 аминокислот и более предпочтительно 10-12 аминокислот. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения пептид имеет по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно 100% аминокислот, имеющих гидрофильную боковую цепь и, таким образом, предпочтительно является высокогидрофильным. С другой стороны, пептид имеет 50% или менее, предпочтительно 40% или менее, более предпочтительно 30% или менее, более предпочтительно 20% или менее, более предпочтительно 10% или менее и наиболее предпочтительно 0% аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь, и, таким образом, предпочтительно является низкогидрофобным. По настоящему изобретению "аминокислота, имеющая гидрофильную боковую цепь", 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 "аминокислота, имеющая гидрофобную боковую цепь", относится к аланину (Ala), валину (Val), изолейцину (Ile), лейцину (Leu), метионину (Met), фенилаланину (Phe), тирозину (Tyr) и триптофану (Trp), но не является ограниченным этим. В дополнение к аминокислотам, присутствующим в природе, можно использовать их варианты, без ограничения. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения аминокислота, имеющая гидрофильную боковую цепь, предпочтительно представляет собой аминокислоту с электрическим зарядом, такую как аргинин (Arg), гистидин (His), лизин (Lys), аспарагиновая кислота (Asp) или глутаминовая кислота (Glu), но не является ограниченным этим. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения растворимый в воде пептид может содержать по меньшей мере 3 аминокислоты с электрическим зарядом, предпочтительно, по меньшей мере 5 аминокислот с электрическим зарядом, и более предпочтительно, по меньшей мере 7 аминокислот с электрическим зарядом, но не является ограниченным этим.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения пептид содержит пять или менее, предпочтительно четыре или менее, более предпочтительно три или менее, более предпочтительно две или менее, более предпочтительно одну или менее аминокислот и наиболее предпочтительно не имеет аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения пептид может представлять собой пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 1, пептид Keramin2, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2, или пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 3, но не является ограниченным этим.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению имеет функцию стимуляции роста кератиноцитов и клеток ННДРС. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению имеет функцию активации пути передачи сигнала WNT. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению приводит к транслокации бета-катенина в ядро.

Соединение по настоящему изобретению само по себе имеет превосходную стабильность, однако его стабильность можно дополнительно улучшать посредством модификации любой аминокислоты, составляющей пептид, конъюгированный с соединением. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения N-конец пептида можно конъюгировать с защитной группой, выбранной из группы, состоящей из группы ацетила, группы флуоренилметоксикарбонила, группы формила, группы пальмитоида, группы миристила, группы стеарила и полиэтиленгликоля (PEG), для дополнительного улучшения стабильности. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения пептид можно конъюгировать с защитной группой, выбранной из группы, состоящей из группы ацетила, группы флуоренилметоксикарбонила, группы формила, группы пальмитоида, группы миристила, группы стеарила и полиэтиленгликоля (PEG), для дополнительного улучшения стабильности.

Модификация аминокислоты, как упомянуто выше, намного улучшает стабильность соединения по

настоящему изобретению. По настоящему изобретению термин "стабильность" используют для включения не только стабильности "in vivo", но также стабильности "in vitro", такой как стабильность при хранении (например, стабильность при хранении при комнатной температуре). Также вышеупомянутая защитная группа защищает соединение по настоящему изобретению от атаки протеолитических ферментов in vivo и in vitro.

Настоящее изобретение относится также к композиции для лечения или улучшения при потере волос, содержащей соединение в качестве активного ингредиента. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к композиции для улучшения состояния кожи, содержащей пептид в качестве активного ингредиента. По настоящему изобретению композиция может находиться в форме фармацевтической композиции или продукта для здорового питания, но не является ограниченным этим.

Поскольку композиция по настоящему изобретению содержит соединение по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, общее между ними в описании опущено, чтобы избежать ненужной избыточности, приводящей к сложности описания.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения лечение или улучшение при потере волос посредством соединения по настоящему изобретению представляет собой стимуляцию роста волос или рост волос. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению имеет способность стимулировать рост кератиноцитов и клеток ННДРС и стимулировать путь передачи сигнала бета-катенина, представляющий собой репрезентативный путь передачи сигнала белка WNT. В ходе тестов на животных, проведенных на основании этих результатов, можно обнаружить, что соединение по настоящему изобретению заметно стимулирует рост волос. Таким образом, композиция по настоящему изобретению является очень эффективной для улучшения роста волос и состояния кожи.

Также в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения улучшение состояния кожи посредством соединения по настоящему изобретению включает улучшение состояния при морщинах, улучшение эластичности кожи, предотвращение старения кожи, улучшение увлажнения кожи, удаление шрамов или регенерацию кожи.

Поскольку композиция по настоящему изобретению содержит соединение по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, общее между ними в описании опущено, чтобы избежать ненужной избыточности, приводящей к сложности описания.

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

В настоящем описании термин "фармацевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения эффективности или активности соединения по настоящему изобретению.

Фармацевтически приемлемый носитель из фармацевтической композиции по настоящему изобретению, который обычно используют для получения, может включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло, но не является ограниченным этим. В дополнение к вышеуказанным ингредиентам, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать смазывающее вещество, увлажняющее средство, подсластитель, придающее вкус средство, эмульгатор, суспендирующее вещество, консервант и т.д. Пригодные фармацевтически приемлемые носители и препараты подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получать в лекарственной форме для единичного дозирования или множественного дозирования с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или наполнителя в соответствии со способом, который может легко осуществлять специалист в данной области. В этом случае состав может находиться в форме раствора в масляной или водной среде, суспензии или эмульсии или может находиться в форме экстракта, порошка, гранулы, таблетки, капсулы или геля (например, гидрогеля) и может дополнительно включать диспергирующее средство или стабилизатор.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить перорально или парентерально при клиническом введении и можно использовать в общих формах фармацевтических препаратов. То есть, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в различных пероральных и парентеральных лекарственных формах в ходе фактического клинического введения. При составлении можно использовать общеупотребительный разбавитель или наполнитель, такой как расширитель, загуститель, связующее, увлажняющее средство, дезинтегрирующее средство, поверхностно-активное вещество и т.д. Твердые препараты для перорального введения включают таблетки, пилюли, порошок, гранулы, капсулы и т.д., и такие твердые препараты получают посредством смешивания по меньшей мере одного наполнителя, такого как крахмал, карбонат кальция, сахара или

лактоза, желатин и т.д. с растительным экстрактом или продуктом ферментации растений. Также, в дополнение к простым наполнителям, можно использовать смазывающие средства, такие как стеарат магния или тальк. Жидкие препараты для перорального введения включают суспензии, растворы, эмульсии, сироп и т.д., и могут включать различные наполнители, такие как увлажняющие средства, придающие вкус средства, ароматизаторы, консерванты и т.д., в дополнение к воде и вазелиновому маслу, которые представляют собой часто используемые простые разбавители. Препараты для парентерального введения включают стерилизованные водные растворы, неводные растворы, суспензии, эмульсии, лиофилизированные препараты и суппозитории. В качестве неводных растворителей или суспензий можно использовать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, пригодные для инъекции сложные эфиры, такие как этилолеат и т.д. В качестве основы для суппозитория можно использовать витепсол, макрогол, Tween 61, масло какао, лауриновый жир, глицерин, желатин и т.д.

Единичная дозированная форма может содержать, например, 1, 2, 3 или 4 индивидуальные дозы, или 1/2, 1/3 или 1/4 индивидуальной дозы. Индивидуальная доза содержит количество активного лекарственного средства, которое вводят за одно применение, и это обычно соответствует полной ежедневной дозе, 1/2, 1/3 или 1/4 ежедневной дозы.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получать в лекарственной форме для единичного дозирования или множественного дозирования с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или наполнителя в соответствии со способом, который может легко осуществлять специалист в данной области. В этом случае состав может находиться в форме раствора в масляной или водной среде, суспензии или эмульсии или может находиться в форме экстракта, порошка, гранулы, таблетки, капсулы или геля (например, гидрогеля) и может дополнительно включать диспергирующее средство или стабилизатор.

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

В настоящем описании термин "косметически эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения эффективности улучшения кожи, для композиции по настоящему изобретению.

Косметическую композицию по настоящему изобретению можно получать в любом составе, обычно получаемом в данной области. Например, ее можно составлять в растворе, суспензии, эмульсии, пасте, геле, креме, лосьоне, порошке, мыле, содержащем поверхностно-активное вещество очищающем средстве, масле, порошкообразной основе, эмульсионной основе, восковой основе и спрее и т.д., но без ограничения этим. Более конкретно, ее можно получать в различных формах, таких как лосьон для кожи, косметическое молочко, питательный крем, массажный крем, эссенция, крем для области вокруг глаз, очищающий крем, очищающая пена, очищающая жидкость, маска, спрей, порошок, тоник для волос, крем для волос, лосьон для волос, шампунь для волос, ополаскиватель для волос, кондиционер для волос, спрей для волос, аэрозоль для волос, помада, раствор, такой как гель и т.д., золь-гель, эмульсия, масло, воск, аэрозоль и т.д., но без ограничения этим.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой пасту, крем или гель, масло животного происхождения, растительное масло, воск, парафин, крахмал, трагакант, производное целлюлозы, полиэтиленгликоль, силикон, бентонит, диоксид кремния, тальк или оксид цинка и т.д., можно использовать в качестве ингредиента-носителя.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой порошок или спрей, лактозу, тальк, диоксид кремния, гидроксид алюминия, силикат кальция или порошок полиамида можно использовать в качестве ингредиента-носителя, и особенно состав в форме спрея может дополнительно включать пропеллент, такой как хлорфторуглерод, пропан/бутан или диметиловый эфир, но не является ограниченным этим.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой раствор или эмульсию, растворитель, солюбилизатор или эмульгатор можно использовать в качестве ингредиента-носителя. Например, можно использовать воду, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутилглицеролевое масло, сложный эфир глицерина и алифатических кислот, полиэтиленгликоль или сложный эфир сорбита и жирной кислоты, но без ограничения этим.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой суспензию, жидкий разбавитель, такой как вода, этанол или пропиленгликоль, суспензию, такую как этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтиленовый сложный эфир сорбитана и полиоксиэтиленовый сложный эфир сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар или трагакант и т.д. можно использовать в качестве ингредиента-носителя, но без ограничения этим.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой содержащее поверхностно-активное вещество очищающее средство, сульфат алифатического спирта, сульфат эфира алифатического спирта, сложный моноэфир сульфоянтарной кислоты, изетионат, производное имидазолина, метилтаурат, саркозинат, сульфат эфира амида жирной кислоты, алкиламидобетаин, алифатический спирт, глицерид жирной кислоты, диэтаноламид жирной кислоты, растительное масло, производное ланолина или этоксили-

рованный сложный эфир глицерина и жирной кислоты и т.д., можно использовать в качестве ингредиента-носителя, но без ограничения этим.

Когда состав по настоящему изобретению представляет собой шампунь для волос, ингредиенты основы для составления шампуня, такие как загуститель, поверхностно-активное вещество, средство для контроля вязкости, увлажнитель, средство для контроля pH, консервант, эфирное масло и т.д., смешивают с соединением по настоящему изобретению. В качестве загустителя можно использовать CDE. В качестве поверхностно-активного вещества можно использовать анионное поверхностно-активное вещество, такое как LES, и амфотерное поверхностно-активное вещество, такое как кокамидопропилбетаин. В качестве средства для контроля вязкости, можно использовать поликватер. В качестве увлажнителя можно использовать глицерин. В качестве средства для контроля pH можно использовать лимонную кислоту и гидроксид натрия. В качестве консерванта можно использовать экстракт грейпфрута. В дополнение к этому, можно добавлять эфирное масло, такое как масло кедр, масло перечной мяты, масло розмарина и т.д., и аминокислоты шелка, пентанол, витамин E и т.д. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, по отношению к 100 частям по массе соединения по настоящему изобретению можно смешивать 5-10 частей по массе CDE, 30-40 частей по массе LES, 10-20 частей по массе кокамидопропилбетаина, 0,1-0,2 частей по массе поликватера, 5-10 частей по массе глицерина, 0,1-1,01 частей по массе экстракта грейпфрута, 0,5-1 частей по массе аминокислот шелка, 0,5-1 частей по массе пентанола, 0,5-2 частей по массе витамина E, и 0,01-0,1 частей по массе любого из масел кедр, перечной мяты, розмарина в качестве эфирного масла, но без ограничения этим.

Ингредиенты, включенные в косметическую композицию по настоящему изобретению, включают ингредиенты, общепотребительные для косметических композиций, в дополнение к соединению по настоящему изобретению и ингредиентам-носителям, в качестве активных ингредиентов. Например, она может дополнительно включать общепринятое вспомогательное средство, такое как стабилизатор, солюбилизатор, витамин, пигмент и ароматизатор, но без ограничения этим.

Далее в настоящем описании настоящее изобретение подробно объяснено применительно к примерам.

Однако следующие примеры представлены только для иллюстрации настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения не ограничен таким образом.

Пример 1. Синтез соединения по настоящему изобретению.

1.1. Синтез пептида.

1.1.1. Синтез пептида из SEQ ID NO: 3.

700 мг хлортритил-хлоридной смолы (смола CTL; Nova biochem [0064], кат. № 01-64-0021) помещали в реактор и перемешивали в течение 3 мин после добавления 10 мл метилхлорида (MC). После удаления раствора добавляли 10 мл диметилформамида (DMF). Затем после перемешивания в течение 3 мин растворитель снова удаляли.

После добавления 10 мл дихлорметана (DCM) в реактор 200 ммоль Fmoc-Cys(trt)-OH (Bachem, Swiss) и 400 ммоль диизопропилэтиламина (DIEA) добавляли и хорошо растворяли посредством перемешивания. После проведения реакции в течение 1 ч с перемешиванием смесь промывали и растворяли с использованием метанола и DIEA (2:1) в DCM. После проведения реакции в течение 10 мин смесь промывали с использованием избытка DCM/DMF (1:1). После удаления раствора с последующим добавлением 10 мл DMF и перемешиванием в течение 3 мин растворитель снова удаляли. После добавления 10 мл раствора для снятия защиты (20% пиперидин/DMF) в реактор смесь перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре и затем раствор удаляли. После добавления снова такого же количества раствора для снятия защиты и проведения реакции в течение 10 мин раствор удаляли и смолу Cys(trt)-CTL подготавливали посредством промывки дважды с использованием DMF, один раз с использованием MC и один раз с использованием DMF, в течение 3 мин, соответственно. После добавления 10 мл DMF в другой реактор, 200 ммоль Fmoc-His(trt)-OH (Bachem, Swiss) и 200 ммоль Вор добавляли и хорошо растворяли посредством перемешивания. После добавления 400 ммоль DIEA в реактор в двух фракциях смесь перемешивали в течение по меньшей мере 5 мин до растворения всех твердых веществ. Полученный раствор смеси аминокислот добавляли в реактор, содержащий смолу со снятой защитой, и проводили реакцию в течение 1 ч при комнатной температуре с перемешиванием. После удаления реакционного раствора, с последующим перемешиванием с раствором DMF 3 раза, по 5 мин соответственно, раствор удаляли. Небольшое количество смолы после реакции отбирали и подвергали тесту Кайзера (нингидриновому тесту) для определения степени реакции. Смолу His(trt)-Cys(trt)-CTL подготавливали таким же способом, как описано выше, посредством снятия защиты 2 раза с использованием раствора для снятия защиты. После достаточной промывки с использованием DMF и MC и проведения теста Кайзера еще раз проводили присоединение аминокислоты следующим образом, таким же способом, как описано выше.

В соответствии с выбранной аминокислотной последовательностью проводили цепную реакцию в этом порядке: Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Arg, Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Val, Fmoc-Arg, Fmoc-Thr, Fmoc-Gln(trt) и Fmoc-Arg(pbf). После проведения реакции Fmoc-защитной группы с раствором для снятия защиты дважды в течение 10 мин, соответственно, раствор удаляли посредством промывки лунки. После проведения

ацелирования в течение 1 ч посредством добавления уксусного ангидрида, DIEA и HoBt, полученную пептидную смолу промывали 3 раза, каждый раз с использованием DMF, MC и метанола, высушивали посредством медленного пропускания газа азота, полностью высушивали в присутствии P₂O₅ под пониженным давлением, проводили реакцию с использованием 30 мл уходящего раствора (содержащего 95% трифторуксусной кислоты, 2,5% дистиллированной воды и 2,5% тиоанизола) в течение 2 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. Смолу фильтровали и промывали небольшим количеством раствора TFA, после чего фильтрат объединяли с исходным раствором. После дистилляции под пониженным давлением для уменьшения общего объема приблизительно до половины преципитацию индуцировали добавлением 50 мл холодного эфира и сформированные преципитаты собирали центрифугированием, с последующей промывкой дважды холодным эфиром. После удаления исходного раствора полученное вещество достаточно высушивали в атмосфере азота с получением 0,65 г неочищенного пептида NH₂-Arg-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH (SEQ ID NO: 3) (выход: 92,6%). Молекулярную массу измеряли как 1287,1 (теоретическое значение: 1286,5) с использованием анализатора молекулярной массы.

1.1.2. Синтез пептида из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Пептид из SEQ ID NO: 1 (Glu-Leu-Ile-Glu-His-Gly-Gly-Gly-Arg-Pro-Ala-Asp: ELIEHGGGRPAD) и пептид из SEQ ID NO: 2 (Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His: Ac-YKSKKGGWTH) синтезировали с использованием такого же способа, как в примере 1.1.1.

Таблица 1

SEQ ID No.	аминокислотная последовательность	измеренное значение (в анализаторе молекулярной массы)	
		измеренное 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.

1 ммоль пептидной смолы и 10 мл 1-метил-2-пирролидона (NMP) помещали в пептидный реактор и проводили реакцию в течение 30 мин после добавления 270 мг (2,0 экв.) 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) и 759 мг (2,0 экв.) гексафторфосфата N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)уриония, гексафторфосфата O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуриония. После добавления 388 мг (3 экв.) N,N-диизопропилэтиламина (DIEA) и 624 мг (2,0 экв.) аналога финастеридасмесь подвергали реакции в течение 24-72 ч при комнатной температуре для получения пептидной смолы после реакции посредством фильтрации. После проведения реакции полученной смолы в течение 2 ч при комнатной температуре с раствором для расщепления смолы и защитную группу удаляли. После перекристаллизации с использованием 10 мл (10 ммоль) диэтилового эфира получали гибридный пептид. Схема реакции для соединения, имеющего структуру, конъюгирующую финастерид и пептид с помощью ковалентной связи, подробно описана ниже.

Схема реакции 1

Схема реакции для гибридного пептида пептид-финастерид

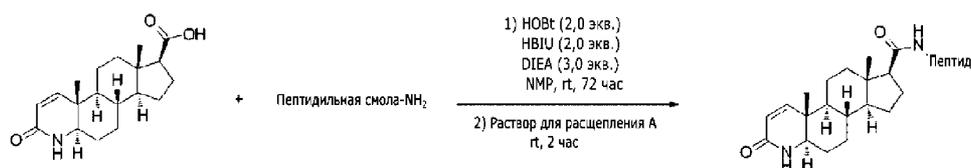


Схема реакции 2

Схема реакции для гибридного пептида Nokkin-финастерид

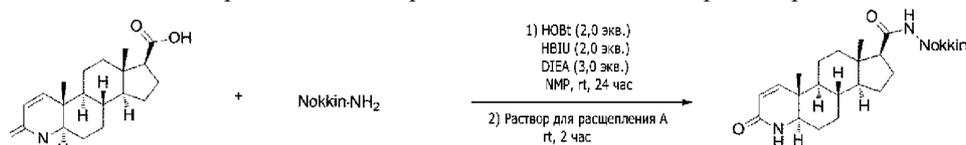


Схема реакции 3

Схема реакции для гибридного пептида Keramin2-финастерид

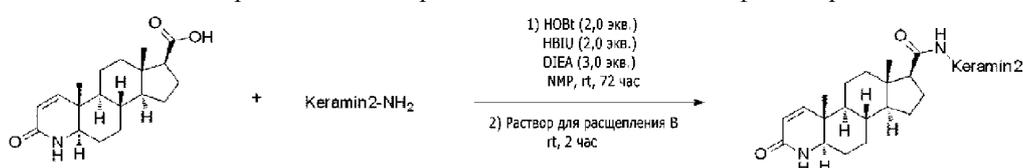
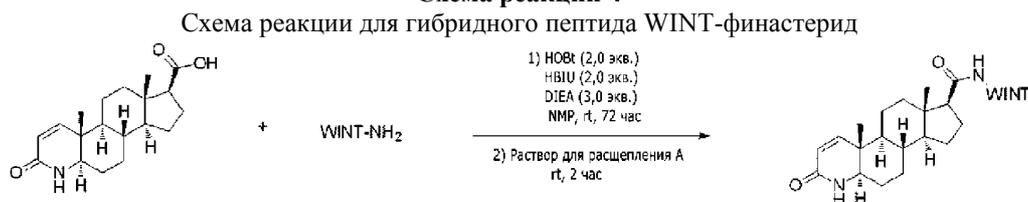


Схема реакции 4



Экспериментальный пример 1. Тестирование растворимости соединения по настоящему изобретению.

Соединение финастерид-Nokkin (соединение 1), соединение финастерид-Keramin2 (соединение 2), соединение финастерид-WINT (соединение 3), полученные в примере 1.2, и финастерид соответственно растворяли в дистиллированной воде, каждое в концентрации 10 мг/мл.

В результате подтвердили, что собственно финастерид являлся плохо растворимым в воде, в то время как соединения 1-3 по настоящему изобретению все полностью растворялись в воде (фиг. 1)

Экспериментальный пример 2. Анализ эффекта соединения по настоящему изобретению на активность 5 α -редуктазы.

Для подтверждения эффекта соединения по настоящему изобретению на активность 5 α -редуктазы сначала экстракты клеток печени, как известно, имеющие большое количество 5 α -редуктазы, собирали в ходе способа экстракции белка. После реакции тестостерона с финастеридом или соединениями 1-3 по настоящему изобретению экстракты клеток печени помещали в соответствующий раствор и проводили реакцию в течение 1 ч при 37°C. Продукт реакции после помещения экстрактов клеток печени в тестостерон и проведения реакции в течение 1 ч при 37°C представляет собой контроль. После завершения реакции количество тестостерона и ДНТ подтверждали посредством HPLC. Анализ HPLC проводили в следующих условиях:

колонка C18,

УФ 240 нм,

скорость потока: 1 мл/мин,

подвижная фаза: А: 0,1% муравьиная кислота в воде, В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле,

градиент: 0 мин В 5% ~30 мин В 80%.

В результате при сравнении с контролем концентрация тестостерона увеличивалась при обработке финастеридом и соединениями по настоящему изобретению, и концентрация ДНТ пропорционально этому уменьшалась. Также при сравнении со случаем обработки финастеридом подтвердили, что увеличение концентрации тестостерона и уменьшение концентрации ДНТ являлись более заметными при обработке соединением по настоящему изобретению (см. фиг. 2а и 2б).

Экспериментальный пример 3. Эффект соединения по настоящему изобретению на рост кератиноцитов.

Для анализа сходных эффектов и ингибирующих эффектов факторов роста по отношению к соединению, синтезированному в примере 1.2, колориметрический анализ с сульфородамино В (SRB) проводили с использованием кератиноцитов HaCaT (Korean Cell Line Bank) в соответствии со способом Rizzino et al. (Rizzino, et al. Cancer Res. 48:4266 (1988)).

Кератиноциты HaCaT культивировали в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч при 37°C в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Gibco, U.S.A.), содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку (FBS; Sigma), после инокуляции в каждую лунку 96-луночного планшета 3000 клеток. Культивируемые линии клеток обрабатывали 1% раствором трипсина для открепления культивируемых линий клеток от дна культурального флакона и центрифугировали для сбора осадков клеток. Их ресуспендировали в культуральной среде DMEM без FBS и культивировали в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч при 37°C. Через 24 ч среду заменяли на такую же бессывороточную культуральную среду и клетки культивировали в течение 72 ч в таких же условиях, как описано выше, с нулевым образцом, разведенным в 10% DMSO в стерильных условиях, в качестве контроля, соединениями формул 1-3 по настоящему изобретению (50 мкМ), финастеридом (50 мкМ) и EGF (100 нМ), используемым в качестве положительного контроля. После удаления супернатанта и фиксации клеток с использованием этанола клетки промывали три раза раствором фосфатно-солевого буфера (PBS). После удаления раствора для промывки и обработки колориметрическим раствором SRB, с последующей достаточной промывкой 1% уксусной кислотой, клетки наблюдали под микроскопом для оценки жизнеспособности клеток. Кроме того, измеряли поглощение в ультрафиолетовых лучах 560 нм для анализа пролиферации клеток.

После обработки кератиноцитов соединением по настоящему изобретению и наблюдения морфологических изменений в клетках через 72 ч подтвердили, что соединение по настоящему изобретению изменяло рост и морфологическую форму кератиноцитов (фиг. 3а). Также подтвердили, что рост кератиноцитов был сильно увеличен при обработке соединением по настоящему изобретению по сравнению со случаем обработки финастеридом (фиг. 3б).

Экспериментальный пример 4. Эффект соединения по настоящему изобретению на рост клеток ННДРС.

Эффект соединений по настоящему изобретению на рост клеток ННДРС (ATCC/U.S.A.) подтверждали таким же способом, как в экспериментальном примере 3. В этом случае MNX (10 мкМ) и IGF-1 (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля.

В результате подтвердили, что соединение по настоящему изобретению изменяло рост и морфологическую форму клеток ННДРС (фиг. 4а). Также подтвердили, что рост клеток ННДРС был сильно увеличен при обработке соединением по настоящему изобретению по сравнению со случаем обработки финастеридом (фиг. 4б).

Экспериментальный пример 5. Анализ эффекта соединения по настоящему изобретению на транслокацию бета-катенина в ядро.

Через 5 ч после обработки клеток ННДРС, культивированных в течение 48 ч, соединениями по настоящему изобретению, синтезированными в примере 1.2, эффектом соединения по настоящему изобретению на транслокацию бета-катенина, который представляет собой сигнальное вещество, необходимое для стимуляции роста волос, в ядро, измеряли посредством репрезентативного пути передачи сигнала белка WNT. Экспрессию бета-катенина наблюдали посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела против бета-катенина (SantaCruz, U.S.A.) и подтверждали, был ли бета-катенин транслоцирован в ядро, посредством иммуногистохимии с использованием того же антитела. В частности, клетки ННДРС культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч при 37°C после инокуляции в каждую лунку 6-луночного планшета 100000 клеток. Среду заменяли на бессывороточную среду DMEM и затем после обработки клеток финастеридом соединением финастерид-WINT, WINT соответственно в концентрациях 5 и 50 мкМ, клетки культивировали в течение 24 ч. После экстракции ядерного и цитоплазматического белка с использованием набора для экстракции белка проводили вестерн-блоттинг в следующих условиях:

приготовление 12% SDS-PAGE,

нанесение 15 мкг белка на SDS-PAGE,

перенос на мембрану PVDF,

блокирование с использованием раствора 5% сухого снятого молока в течение 1 ч при комнатной температуре,

реакция 1-го антитела (антитела против бета-катенина, антитела против HDAC, антитела против альфа-тубулина) при комнатной температуре в течение 2 ч в концентрации 1/3000,

промывка три раза с использованием PBST в течение 10 мин,

реакция 2-го антитела при комнатной температуре в течение 1 ч в концентрации 1/5000,

промывка три раза с использованием PBST в течение 15 мин,

детекция.

В результате подтвердили, что при обработке соединением по настоящему изобретению экспрессия бета-катенина увеличивалась.

Также подтвердили, что бета-катенин транслоцируется из цитоплазмы в ядро посредством соединения по настоящему изобретению даже при измерении того, транслоцируется ли бета-катенин в ядро, с использованием иммуногистохимии в клетках ННДРС, и что соединение по настоящему изобретению еще существует в цитоплазме и имеет активность (фиг. 5а и 5б).

Экспериментальный пример 6. Анализ эффекта соединения по настоящему изобретению на ингибирование передачи сигнала BMP.

Через 5 ч после обработки клетки ННДРС, культивированных в течение 48 ч, соединениями по настоящему изобретению, синтезированными в примере 1.2, эффектом соединения по настоящему изобретению на активность фосфо-Smad1/5/8, который представляет собой сигнальное вещество, необходимое для ингибирования потери волос, измеряли посредством репрезентативного пути передачи сигнала белка BMP. Экспрессию фосфо-Smad1/5/8 подтверждали посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела против фосфо-Smad1/5/8. В частности, клетки ННДРС культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч при 37°C после инокуляции в каждую лунку 6-луночного планшета 100000 клеток. Среду заменяли на бессывороточную среду DMEM и затем после обработки клеток финастеридом и соединением финастерид-Nokkin соответственно в концентрациях 0,5, 5 и 50 мкМ клетки культивировали в течение 24 ч. После экстракции ядерного и цитоплазматического белка с использованием набора для экстракции белка проводили вестерн-блоттинг в следующих условиях:

приготовление 12% SDS-PAGE,

нанесение 15 мкг белка на SDS-PAGE,

перенос на мембрану PVDF,

блокирование с использованием раствора 5% сухого снятого молока в течение 1 ч при комнатной температуре,

реакция 1-го антитела (антитела против фосфо-Smad1/5/8, антитела против HDAC, антитела против альфа-тубулина) при комнатной температуре в течение 2 ч в концентрации 1/3000,

промывка три раза с использованием PBST в течение 10 мин,

реакция 2-го антитела при комнатной температуре в течение 1 ч в концентрации 1/5000, промывка три раза с использованием PBST в течение 15 мин, детекция.

В результате подтвердили, что при обработке соединением по настоящему изобретению, экспрессия фосфо-Smad1/5/8 в ядре уменьшалась (фиг. 6a и 6b).

Экспериментальный пример 7. Анализ эффекта соединения по настоящему изобретению на экспрессию DKK-1.

Эффект соединения по настоящему изобретению на экспрессию мРНК DKK-1, представляющего собой репрезентативный белок потери волос, экспрессированный посредством ДНТ, подтвердили. В частности, клетки ННДРС культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч при 37°C после инокуляции в каждую лунку 6-луночного планшета 100000 клеток. После реакции тестостерона с финастеридом или соединением финастерид-Nokkin из соединений 1-3 по настоящему изобретению, соединением финастерид-Keratin2 и соединением финастерид-WINT экстракты клеток печени помещали в соответствующий раствор и проводили реакцию в течение 1 ч при 37°C. Продукт реакции после помещения экстрактов клеток печени в тестостерон и проведения реакции в течение 1 ч при 37°C использовали в качестве положительного контроля. Среду заменяли на бессывороточную среду DMEM, и затем, после обработки клеток финастеридом и соединением финастерид-Nokkin, соединением финастерид-Keratin2 и соединением финастерид-WINT, соответственно, в концентрации 50 мкМ, клетки культивировали в течение 24 ч. После экстракции РНК из клеток с использованием набора для экстракции РНК, RT-ПЦР проводили с использованием следующих праймеров.

1. DKK-1

прямой праймер: (5') TGATGAGTACTGCGCTAGTC (3') (SEQ ID NO: 4),

обратный праймер: (5') CTCCTATGCTTGGTACACAC (3') (SEQ ID NO: 5).

2. GAPDH

прямой праймер: (5') GGAGCCAAAAGGGTCATCAT (3') (SEQ ID NO: 6),

обратный праймер: (5') GTGATGGCATGGACTGTGGT (3') (SEQ ID NO: 7).

В результате подтвердили, что соединение по настоящему изобретению дополнительно ингибировало увеличенную экспрессию DKK-1 в положительном контроле больше, чем в случае обработки финастеридом, и, в частности, оно могло ингибировать экспрессию DKK-1 до уровня, даже более низкого, чем в отрицательном контроле, который ничем не обрабатывали (фиг. 7a и 7b).

Экспериментальный пример 8. Тестирование роста волос.

Эффект соединения по настоящему изобретению на рост волос подтверждали посредством тестов на животных. В частности, волосы на спине самца мыши C57BL/6 в возрасте 7 недель удаляли с использованием крема для депиляции. После подготовки PBS, финастерид и соединения финастерид-WINT по настоящему изобретению в концентрациях 100 мкг/мл их равномерно наносили на кожу спины мышей один раз в сутки и цвет кожи спины мышей наблюдали посредством получения фотографий с момента, когда цвет начинал становиться черным.

Затем мышей умерщвляли и волосы на коже спины наблюдали посредством окрашивания H&E. С этой целью после сбора кожи спины мышей и фиксации ее в 4% параформальдегиде (PFA) проводили погружение в парафин. После получения срезов кожи спины мышей после погружения толщиной 4 мкм количество волосяных фолликулов подтверждали посредством окрашивания H&E.

В результате подтвердили, что для мышей после нанесения соединения финастерид-WINT по настоящему изобретению явно присутствовал более быстрый рост волос у этих мышей по сравнению с мышами после нанесения PBS или финастерид (фиг. 8a) и что количество волосяных фолликулов заметно увеличивалось по сравнению с контролем и с группой, подвергнутой введению финастерид (фиг. 8b).

Экспериментальный пример 9. Тестирование проницаемости кожи.

Поскольку финастерид представляет собой лекарственное средство, контролирующее гормоны стероидного типа, когда его вводят перорально, могут присутствовать побочные эффекты, такие как вызов системной токсичности посредством распространения через кровь. Таким образом, если оно проникает через кожу даже при нанесении на кожу, существует возможность его проникновения по всему организму и вызова токсичности, и, если оно не проникает через кожу, поскольку остается на коже головы, и не распространяется по всему организму, побочные эффекты финастерид можно ингибировать. В связи с этим после нанесения финастерид и соединения финастерид-WINT по настоящему изобретению на трехмерную искусственную кожу авторы настоящего изобретения подтвердили, проникают ли они через кожу.

С этой целью финастерид и соединение финастерид-WINT по настоящему изобретению соответственно смешивали в смешанном растворителе из 10% этанола, 40% пропиленгликоля и 50% очищенной воды. Тест распространения клеток в камере Франца проводили с использованием трехмерной искусственной кожи. Раствор финастерид и соединения финастерид-WINT наносили на трехмерную искусственную кожу, по 1 мл, соответственно, и оставляли на 24 ч. После отбора образцов раствора из принимающей камеры финастерид и соединение финастерид-WINT, проникшие через кожу, детектировали с

использованием HPLC. Условия детекции финастерида на HPLC представляют собой колонку C18, УФ 210 нм, скорость потока 1,6 мл/мин, ацетонитрил:вода = 45:55, и детекция R.T. составляла 9-10 мин. Для детекции соединения финастерид-WINT по настоящему изобретению анализ мониторингования множественных реакций (MRM), представляющий собой способ детекции соответствующей молекулярной массы, проводили с использованием устройства LC-MS/MS (3200 Qtrap).

В результате подтвердили, что при обработке лекарственным средством только с финастеридом он проникает через кожу и, таким образом, был детектирован и что при обработке лекарственным средством с соединением финастерид-WINT по настоящему изобретению, оно не было детектировано с веществом, проникающим через кожу, и оставалось на коже (фиг. 9a и 9b).

Обобщая экспериментальные результаты экспериментальных примеров 1-9, можно обнаружить, что соединение по настоящему изобретению очень хорошо проявляет функции стимуляции роста волос и ингибирования потери волос, и проявляет функцию борьбы со старением.

Пример получения состава 1: Смягчающий лосьон.

Смягчающий лосьон, содержащий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящий из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения лосьона.

Таблица 2

Ингредиенты	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
консервант, пигмент	по необходимости
бензофенон-9	0,05
ароматизатор	следовые количества
очищенная вода	для доведения
Всего	100

Пример получения состава 2. Питательный крем.

Питательный крем, содержащий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящий из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения питательного крема.

Таблица 3

Ингредиенты	Содержание (масс.%)
Соединение по настоящему изобретению	2,5
масло пенника лугового	3
цетеариловый спирт	1,5
стеариновая кислота	1,5
глицерилстеарат	1,5
вазелиновое масло	10
пчелиный воск	2
полисорбат 60	0,6
сорбитансесквиолеат	2,5
сквалан	3
1,3-бутиленгликоль	3
глицерин	5
триэтаноламин	0,5
ацетат токоферола	0,5
консервант, пигмент	по необходимости
ароматизатор	по необходимости
очищенная вода	для доведения
Всего	100

Пример получения состава 3. Косметическое молочко.

Косметическое молочко, содержащее соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящее из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения лосьона.

Таблица 4

Ингредиенты	Содержание (масс.%)
соединение по настоящему изобретению	2,5
1,3-бутиленгликоль	4
глицерин	4
цетеариловый спирт	0,8
глицерилстеарат	1
триэтаноламин	0,13
ацетат токоферила	0,3
вазелиновое масло	5
сквалан	3
масло ореха макадамия	2
полисорбат 60	1,5
сорбитансесквиолеат	0,5
карбоксивинилполимер	1
консервант, пигмент	по необходимости
ароматизатор	по необходимости
очищенная вода	для доведения
Всего	100

Пример получения состава 4. Эссенция.

Эссенцию, содержащую соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящую из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения эссенции.

Таблица 5

Ингредиенты	Содержание (масс.%)
соединение по настоящему изобретению	2,5
глицерин	10
1,3-бутиленгликоль	5
PEG 1500	2
аллантоин	0,1
DL-пантенол	0,3
ЭДТА-2Na	0,02
гидроксиэтилцеллюлоза	0,1
гиалуронат натрия	8
карбоксивинилполимер	0,2
триэтаноламин	0,18
октилдодецет-16	0,4
этанол	6
ароматизатор, консервант, пигмент	по необходимости
очищенная вода	для доведения
Всего	100

Пример получения состава 5. Сыворотка для волос.

Сыворотку для волос, содержащую соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящую из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения сыворотки для волос.

Таблица 6

Ингредиенты	Содержание (масс.%)
соединение по настоящему изобретению	1
глицерин	10
1,3-бутиленгликоль	5
PEG 1500	2
аллантоин	0,1
DL-пантенол	0,3
ЭДТА-2Na	0,02
гидроксиэтилцеллюлоза	0,1
гиалуронат натрия	8
карбоксивинилполимер	0,2
триэтаноламин	0,18
октилдодецет-16	0,4
этанол	6
ароматизатор, консервант, пигмент	по необходимости
очищенная вода	для доведения
Всего	100

Пример получения состава 6. Тоник для волос.

Тоник для волос, содержащий соединение по настоящему изобретению, полученное в примере 1.2, и состоящий из следующей композиции, получали в соответствии с общим способом получения тоника для волос.

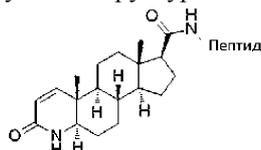
Таблица 7

Ингредиенты	Содержание (масс.%)
соединение по настоящему изобретению	1
глицерин	2
1,3-бутиленгликоль	2

PEG 1500	2
аллантиин	0, 1
DL-пантенол	0, 3
ЭДТА-2Na	0, 02
гиалуронат натрия	8
карбоксивинилполимер	0, 2
триэтаноламин	0, 18
этанол	10
ароматизатор, консервант, пигмент	по необходимости
очищенная вода	для доведения
Всего	100

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное следующей структурой:



причем пептид состоит из 10-12 аминокислот,

пептид является водорастворимым пептидом,

водорастворимый пептид имеет по меньшей мере 70% аминокислот, выбранных 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 аминокислота представляет собой аминокислоту с электрическим зарядом, выбранную из группы, состоящей из аргинина (Arg), гистидина (His), лизина (Lys), аспарагиновой кислоты (Asp) и глутаминовой кислоты (Glu).

3. Соединение по п.1, где водорастворимый пептид имеет по меньшей мере три аминокислоты с электрическим зарядом, выбранные из группы, состоящей из аргинина (Arg), гистидина (His), лизина (Lys), аспарагиновой кислоты (Asp) и глутаминовой кислоты (Glu).

4. Соединение по п.1, где водорастворимый пептид имеет пять или менее аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь.

5. Соединение по п.4, где водорастворимый пептид имеет три или менее аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь.

6. Соединение по п.4, где аминокислота, имеющая 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).

7. Соединение по п.1, где пептид представляет собой пептид Nokkin, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

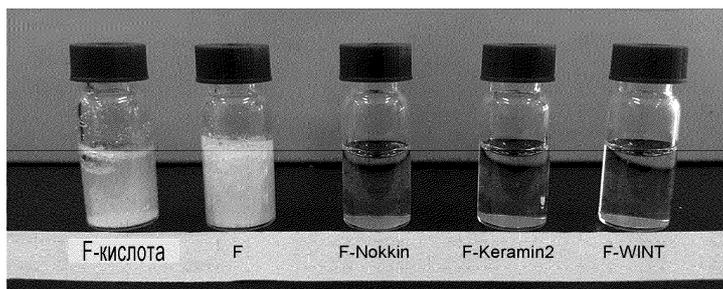
8. Соединение по п.1, где пептид представляет собой пептид Keramin2, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

9. Соединение по п.1, где пептид представляет собой пептид WINT, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

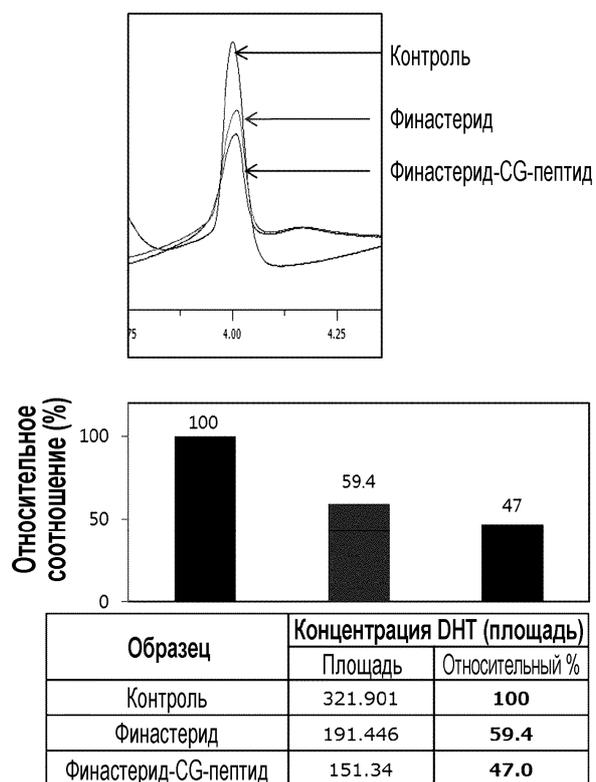
10. Фармацевтическая композиция для предотвращения потери волос или стимуляции роста волос, содержащая соединение по любому из пп.1-9.

11. Косметическая композиция для предотвращения потери волос или стимуляции роста волос, содержащая соединение по любому из пп.1-9.

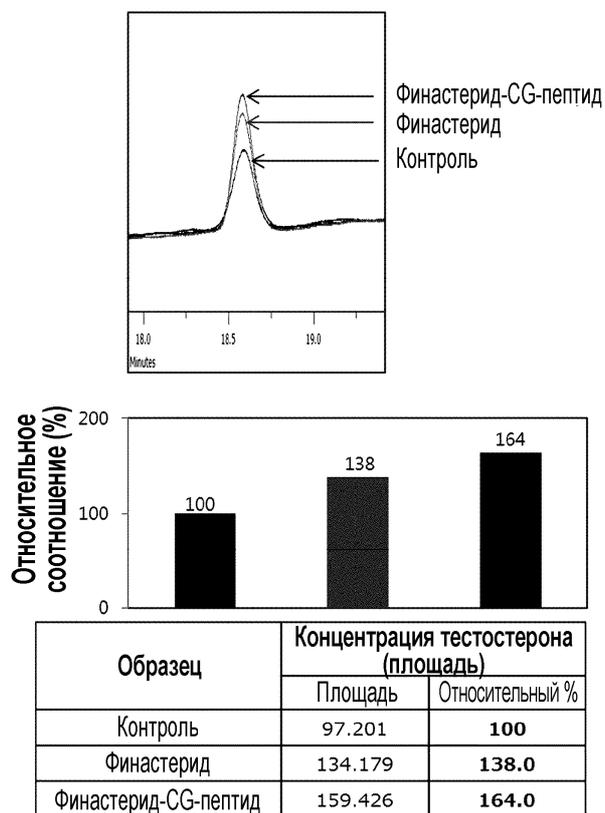
12. Косметическая композиция по п.11, составленная в форме, выбранной из группы, состоящей из лосьона для кожи, косметического молочка, питательного крема, массажного крема, эссенции, крема для области вокруг глаз, очищающего крема, очищающей пены, очищающей жидкости, маски, спрея, порошка, тоника для 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.



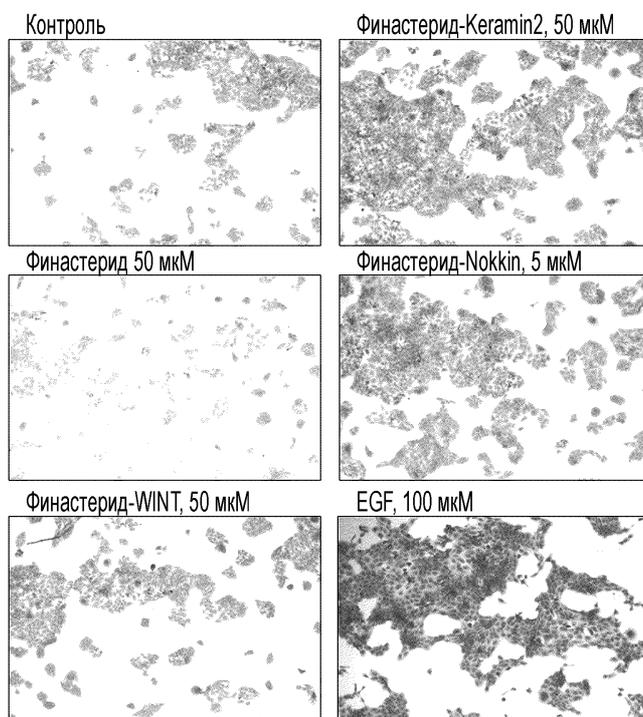
Фиг. 1



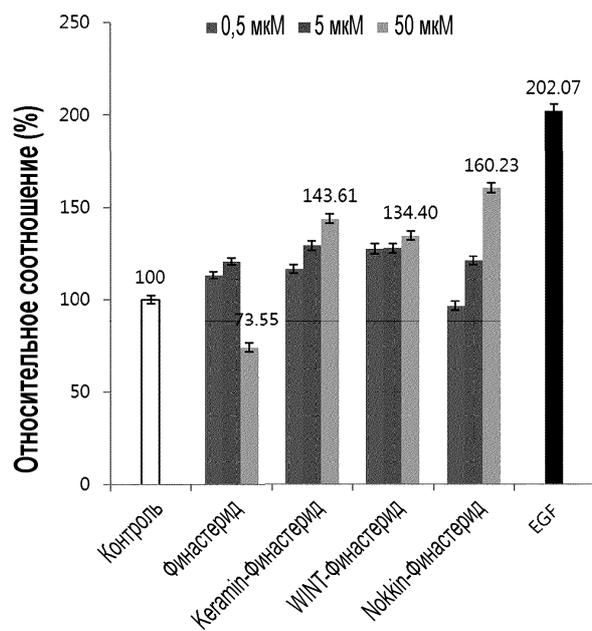
Фиг. 2а



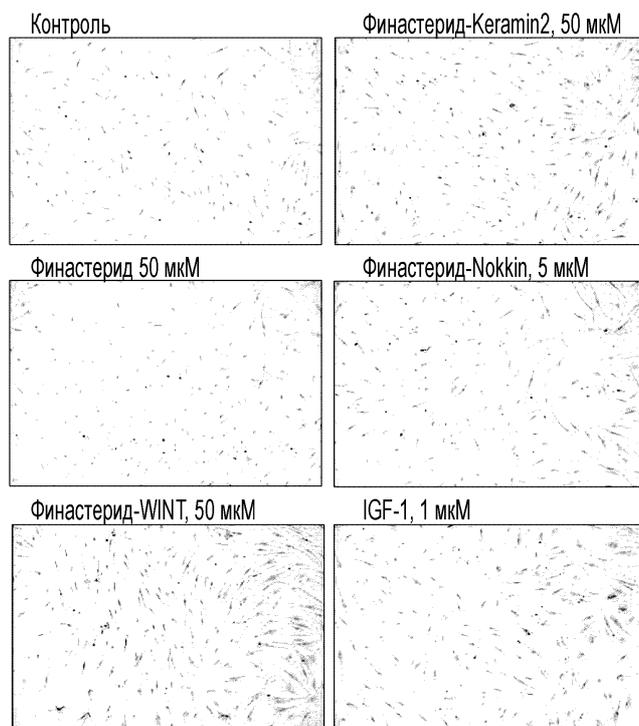
Фиг. 2b



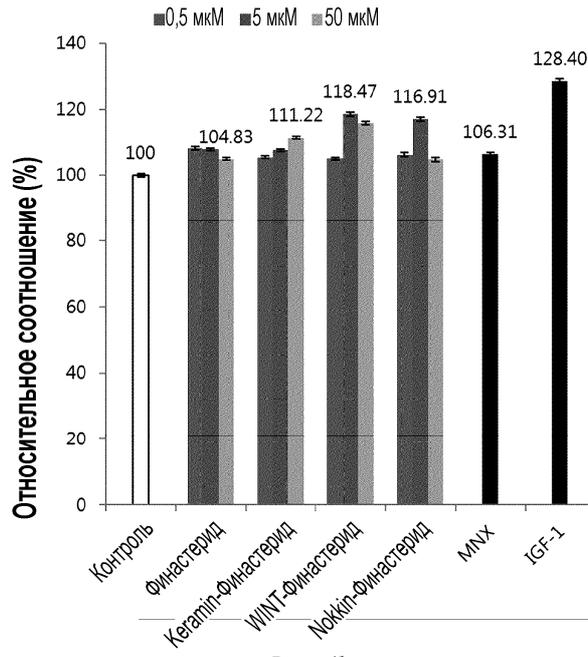
Фиг. 3a



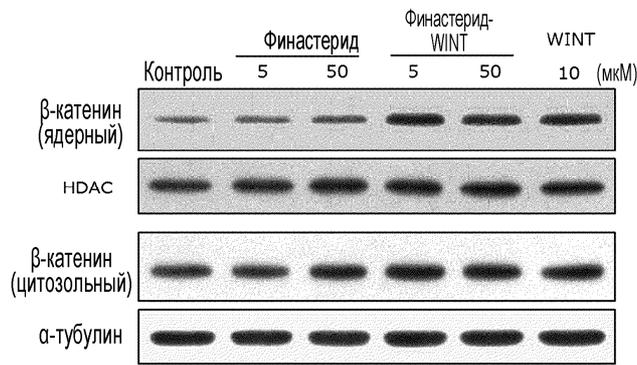
Фиг. 3b



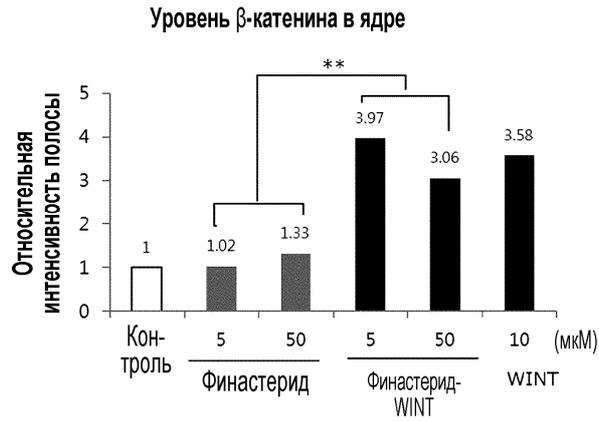
Фиг. 4a



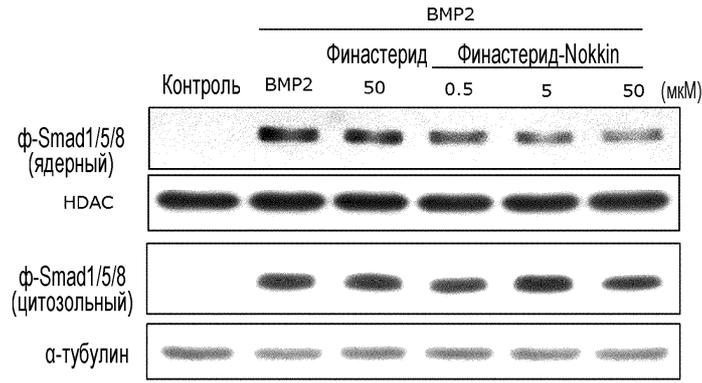
Фиг. 4b



Фиг. 5a

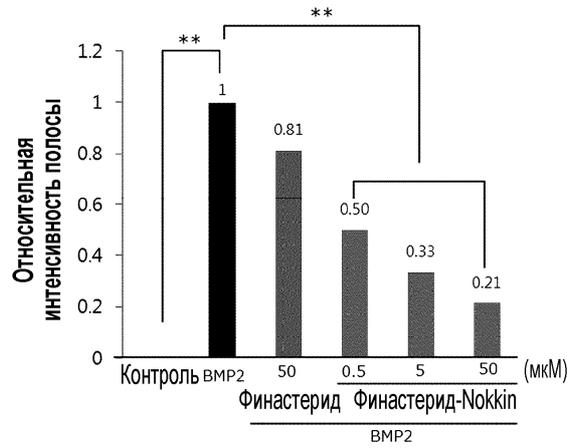


Фиг. 5b

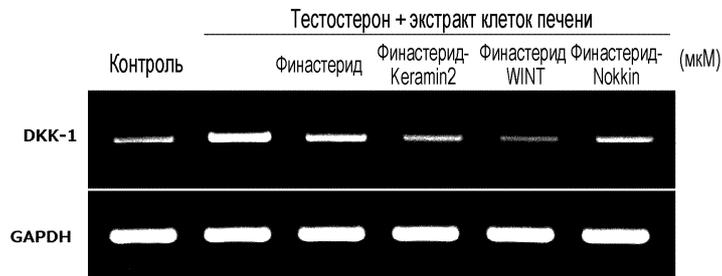


Фиг. 6а

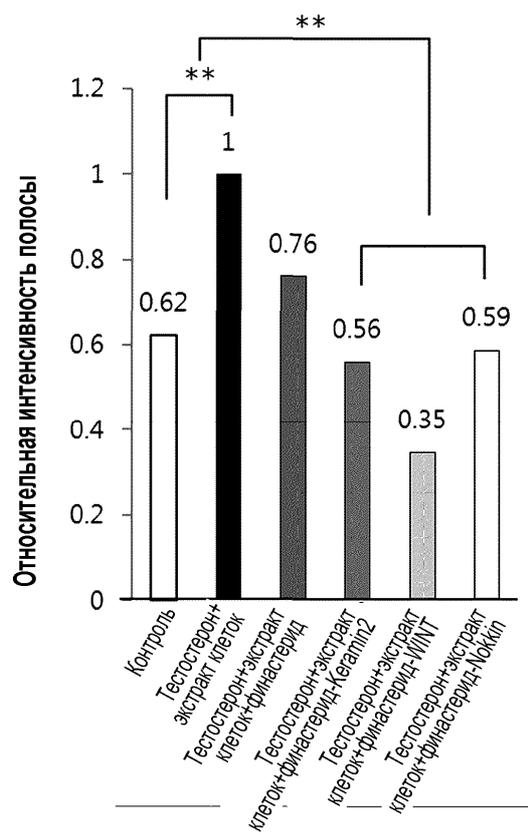
Уровень фосфо-Smad1/5/8 в ядре



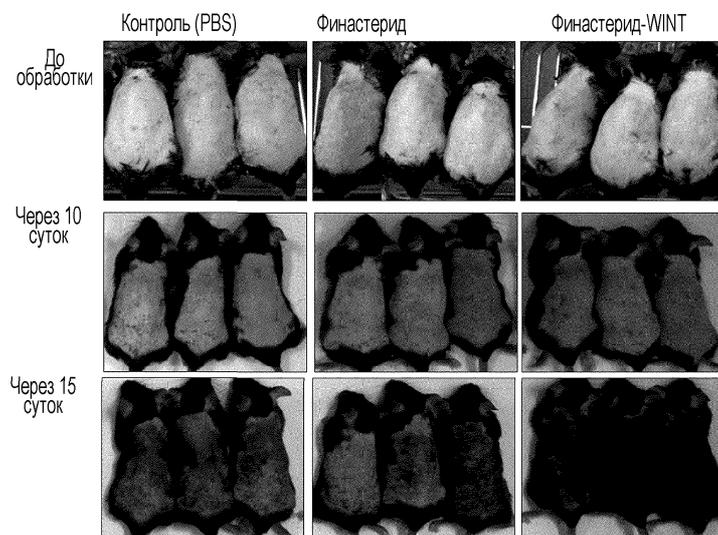
Фиг. 6б



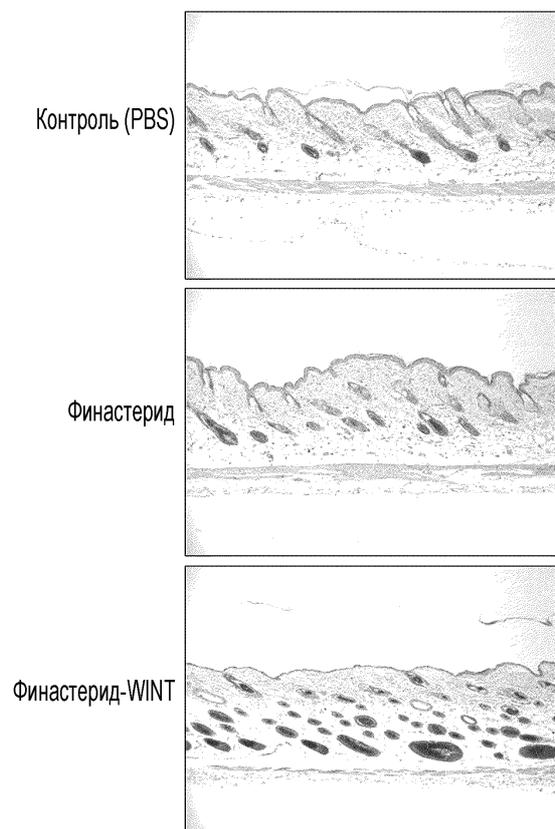
Фиг. 7а



Фиг. 7b

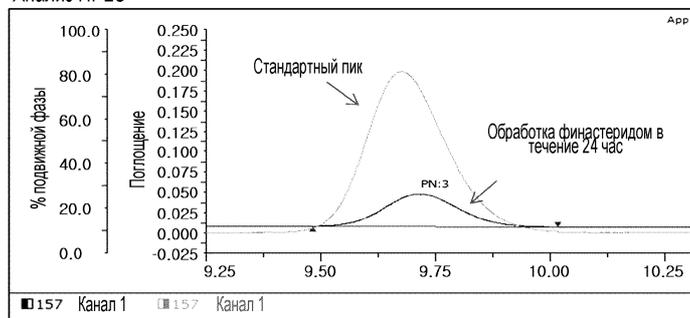


Фиг. 8a



Фиг. 8b

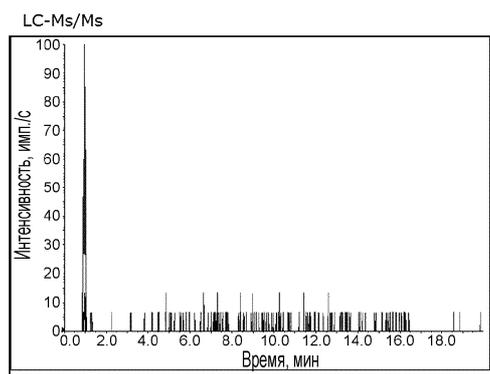
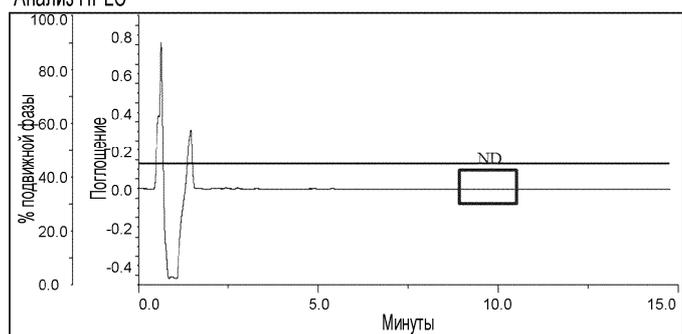
Обработка финастеридом в течение 24 час
Анализ HPLC



Фиг. 9a

Обработка финастеридом-WINT в течение 24 час

Анализ HPLC



Фиг. 9b

