



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.21

(21) Номер заявки
202090179

(22) Дата подачи заявки
2018.06.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/405* (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
C07D 209/18 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)
C07C 255/41 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 275/03 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07F 9/38 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДУЛЯЦИИ РОСТА ВОЛОС

(31) 62/527,775; 62/654,095

(32) 2017.06.30; 2018.04.06

(33) US

(43) 2020.04.24

(86) PCT/US2018/040385

(87) WO 2019/006359 2019.01.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Лоури Уилльям И., Дзунг Майкл И.,
Кристофк Хитер, Лю Сяогуан (US)**

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

(56) WO-A2-2015049365
WO-A2-2013169956
Kyle S. et al. Mitochondrial pyruvate transport:
a historical perspective and future research directions,
Biochem J., 2015, Mar 15; 466(3): 443-454. Kyle S. et al. 15
Mar 2015 (2015/03/15), whole document

Pyrrolo[2,3-b]pyridine derivatives (7-azaindoles)
viii. synthesis and some reactions of 4-methyl-1-
phenyl-1h-4-methyl-1-phenyl-1h-pyrrolo[2,3-b]pyridine-3-
carboxaldehyde, AH-Union Chemical and Pharmaceutical
Research Institute Translated from Zhurnal Obshchei
Khimii, Vol. 34, No. 8, p. 2603-2610. N. Yakhontov et al.,
01 Aug 1964 (1964/08/01), page 2627, compound IX

CAS Registry Number: 1246086-21-4, Entered
STN: 12 Oct 2010. 12 Oct 2010 (2010/10/12)
CAS Registry Number: 1232821-01-0, Entered
STN: 19 Jul 2010. 19 Jul 2010 (2010/07/19)

WO-A1-2013128465
AMIN, Sk. Abdul, et al. Exploring structural
requirements of unconventional Knoevenagel-type indole

derivatives as anticancer agents through comparative QSAR
modeling approaches, Canadian Journal of Chemistry, 2016,
94.7: 637-644. 01 Jan 2016 (2016/01/01), page 32, Table 1,
compound 2b

CAS Registry Number: 2094959-90-5, Entered
STN: 05 May 2017. 05 May 2017 (2017/05/05)

CAS Registry Number: 2022941-63-3, Entered
STN: 02 Nov 2016. 02 Nov 2016 (2016/11/02)

CAS Registry Number: 1417368-01-4, Entered
STN: 23 Jan 2013. 23 Jan 2013 (2013/01/23)

CAS Registry Number: 677327-34-3, Entered STN:
28 Apr 2004. 28 Apr 2004 (2004/04/28)

CAS Registry Number: 1993795-68-8, Entered
STN: 16 Sep 2016. 16 Sep 2016 (2016/09/16)

CAS Registry Number: 1993738-37-6, Entered
STN: 16 Sep 2016. 16 Sep 2016 (2016/09/16)

CAS Registry Number: 1360583-78-3, Entered
STN: 09 Mar 2012. 09 Mar 2012 (2012/03/09)

CAS Registry Number: 1360583-75-0, Entered
STN: 09 Mar 2012. 09 Mar 2012 (2012/03/09)

WO-A1-2004080481
CAS Registry Number: 895304-22-0, Entered STN:

23 Jul 2006. 23 Jul 2006 (2006/07/23)

CAS Registry Number: 895303-82-9, Entered STN:
23 Jul 2006. 23 Jul 2006 (2006/07/23)

CAS Registry Number: 1025594-30-2, Entered
STN: 05 Jun 2008. 05 Jun 2008 (2008/06/05)

CAS Registry Number: 904141-89-5, Entered STN:
24 Aug 2006. 24 Aug 2006 (2006/08/24)

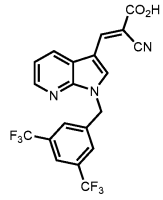
Vishnyakova, K.S. et al. Possible role of
autophagy activation in stimulation of regeneration.
Molecular Biology (01 September 2013), 47(5),
pages: 692-700. Retrieved from URL: <<http://dx.doi.org/10.1134/S002689331305021X>>. 01 Sep
2013 (2013/09/01), page 693

Flores, A. et al. Lactate dehydrogenase activity
drives hair follicle stem cell activation. Nature cell biology
(published online 14 August 2017), volume 19, issue
9, pages: 1017-1026. 14 Aug 2017 (2017/08/14), whole
document

WO-A1-2018039612

(57) Изобретение относится к соединению формулы, представленной ниже, или его фармацевтически приемлемой соли, которое способно ингибировать митохондриальный переносчик пирувата и стимулировать рост волос. Изобретение также относится к способу стимулирования роста волос

или лечения состояний или расстройств, влияющих на рост волос, таких как облысение или алоpecia.



042750 B1

042750 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

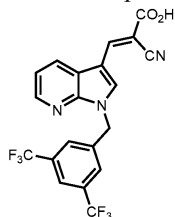
Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/527775, поданной 30 июня 2017 г., и предварительной заявки на патент США 62/654095, поданной 6 апреля 2018 г. Содержание каждой из этих заявок полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Уровень техники

Стволовые клетки волосяного фолликула (HFSC - англ. Hair follicle stem cells) подвергаются последовательным циклам покоя (телогена), перемежающимся короткими периодами пролиферации, коррелирующими с началом цикла роста волос (переход телогена в анаген). Хорошо известно, что пролиферация или активация HFSC является необходимым условием для продвижения цикла роста волос. Несмотря на успехи в вариантах лечения, облысение и алопеция продолжают оставаться состояниями, которые не могут быть успешно вылечены у всех людей. Некоторые из существующих методов лечения неудобны для пользователей, другие требуют хирургического вмешательства или других инвазивных процедур. Необходимы дополнительные методы лечения.

Сущность изобретения

В определенных аспектах в настоящем описании представлено соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных аспектах в настоящем описании представлен способ стимулирования роста волос или лечения состояния или расстройства роста волос, такого как облысение или алопеция, включающие введение пациенту ингибитора MPO, такого как соединение настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предоставлены способы стимулирования роста волос или лечения состояния или расстройства роста волос, такого как облысение или алопеция, включающие введение пациенту ингибитора MPC, такого как соединение настоящего описания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1A-1E показывают, что активность лактатдегидрогеназы повышена в HFSC. Фиг. 1A. ИHC-окрашивание в отношении экспрессии Ldha в цикле роста волос показывает белок Ldha, ограниченный нишей HFSC, припухлостью, обозначенной скобкой. ИHC-окрашивание в отношении Sox9 на серийных срезах разграничивает популяцию HFSC. Масштабная полоска обозначает 20 микрометров. Фиг. 1B. Иммуноблоттинг на FACS-выделенных популяциях HFSC (α 6low/Cd34+ и α 6hiCd34+) в сравнении с общим эпидермисом (Epi) показывает дифференциальную экспрессию Ldha в нише стволовых клеток. Sox9 является маркером HFSC, а β -актин является контролем нагрузки. Фиг. 1C. Колориметрический анализ активности фермента Ldh в эпидермисе показывает наибольшую активность в припухлости (скобки) и подкожном мышечном слое (скобка). Эта активность увеличивается в припухлости на разных этапах цикла роста волос. Активность обозначена фиолетовым цветом; розовый - ядерное контрастирующее окрашивание. Отметим также, что стержни развивающихся волос у пигментированных мышей показывают сильные отложения меланина, как здесь наблюдается; на волосных стержнях никогда не было пурпурного окрашивания, указывающего на активность Ldh. Масштабная полоска обозначает 50 микрометров. Фиг. 1D. Активность Ldh в отсортированных клеточных популяциях, измеренная с использованием анализа с планшет-ридером, также демонстрирует наивысшую активность Ldh в двух отдельных популяциях HFSC (α 6hi/Cd34 и α 6low/Cd34) по сравнению с эпидермальными клетками (Epi) и фибробластами (FB). Каждая полоска представляет средний сигнал для каждого типа клеток, где n=9 мышей объединены из 3 независимых экспериментов. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный t-тест, $p < 0,05$ показано для каждого типа клеток по сравнению с эпидермальными клетками. Фиг. 1E. HFSC и эпидермальные клетки выделяли во время телогена (день 50) с помощью FACS, а метаболиты экстрагировали и анализировали методом ЖХ-МС. Тепловые карты показывают относительные уровни метаболитов гликолитического цикла и цикла ТКК из клеток, выделенных от разных мышей, в независимых экспериментах, в каждом с клетками от трех животных. Звездочки указывают на значительную разницу в уровнях метаболитов между эпидермальными клетками и HFSC. Для e был проведен парный t-критерий; * обозначает $p < 0,05$, ** обозначает $p < 0,01$, *** обозначает $p < 0,001$, ns обозначает $p > 0,05$ и n=9 мышей, объединенных из 3 независимых экспериментов.

Фиг. 2A-2C показывают валидацию основных реагентов и анализов. Фиг. 2A. ИГХ (ИHC) с антителом, распознающим исключительно Ldha (так же, как используется на фиг. 1A). Внизу ИHC с антителом, распознающим множественные изоформы белка Ldh. Масштабная полоска обозначает 20 микрометров. Фиг. 2B. стратегия сортировки, используемая для выделения двух популяций клеток из припухлости.

Данную конкретную сортировку использовали для выделения образцов белка, показанных вестерн-блоттингом на фиг. 1В. Фиг. 2С. Валидация колориметрического анализа активности фермента Ldh. Наибольшая активность фермента Ldh наблюдалась в припухлости HFSC и в мышцах. Активность обозначена пурпурным окрасом; розовый цвет означает ядерный быстрый красный контраст. В отсутствие субстрата лактата не было обнаружено никакой активности (пурпурный окрас). Справа дополнительная валидация колориметрического анализа активности фермента Ldh. Ферментативную активность подавляют, обрабатывая кожу HCl перед добавлением окрашивающего раствора с субстратным лактатом. Активность Ldh (пурпурный окрас) не обнаружена. Кожа, в которой активность фермента не ингибируется соляной кислотой (HCl), проявляет наибольшую активность фермента Ldh в припухлости HFSC и в мышцах. Масштабная полоска обозначает 50 мкм.

Фиг. 3А-3Е показывают, что активность Ldh увеличивается во время активации HFSC. Фиг. 3А. Анализ обогащения набора генов (GSEA - Gene Set Enrichment Analysis) по данным транскриптома РНК-секвенирования из HFSC в сравнении с общим эпидермисом показывает обогащение для связанных с гликолизом генов в HFSC (NES=1,72). Фиг. 3В. GSEA на микроматричных данных транскриптома, полученного из HFSC, против общего эпидермиса показывает обогащение для связанных с гликолизом генов в HFSC (NES=1,45). Результаты были получены от трех мышей каждого состояния. Фиг. 3С. Данные РНК-секвенирования, полученные из HFSC, отсортированные во время телогена или перехода телоген-анаген, показывают индукцию *Ldha21*. Данные представляют собой среднее значение трех отдельных животных в каждый момент времени. Фиг. 3D. Активность Ldh в отсортированных популяциях стволовых клеток, измеренная с использованием анализа с планшет-ридером, показывает повышенную активность Ldh, когда стволовые клетки активируются при переходе телогена в анаген (Tel-Ana). Каждая полоска представляет средний сигнал для каждого условия, где $n=9$ мышей, объединенных из 3 независимых экспериментов. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный t-тест, $p<0,05$. Фиг. 3Е. Тепловая карта, показывающая относительные уровни метаболитов гликолитического цикла и цикла ТКК, экстрагированных в состоянии покоя (телоген, день 50), активированных (телоген-анаген, день 70) и HFSC, которые вернулись в состояние покоя (анаген, день 90). Показанные данные были получены от $n=3$ животных в каждый момент времени в 3 независимых экспериментах.

Фиг. 4А, 4В показывают валидацию измерений стадии цикла роста волос. Фиг. 4А. Анализ данных РНК-секвенирования для подтверждения того, что HFSC при переходе телогена в анаген действительно находились в таком переходе. Известно, что переход телогена в анаген обусловлен передачей сигналов Shh (Gli-факторы являются мишенями) и Wnt (Lef1, Axin, Ccnd1 являются мишенями) и коррелирует с повышенной пролиферацией (Ki67 и Pcsna). Кроме того, Sox4 был ранее идентифицирован как регулятор перехода телоген-анаген. $n=3$ мыши на момент времени. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный t-тест, $p<0,05$. Фиг. 4В. Окрашивание для Ki-67 маркирует делящиеся клетки на различных стадиях цикла роста волос. Скобки обозначают нишу HFSC. Масштабная полоска обозначает 100 мкм.

Фиг. 5А-5G показывают, что делеция *Mpr1* увеличивает продукцию лактата и активацию HFSC. Фиг. 5А. У животных с *Mpr1*fl/fl наблюдается пигментация и рост волос, что соответствует вступлению в цикл анагена через 8,5 недель, тогда как у животных с *Mpr1*+/+ дорсальная пигментация и рост волос на ранней стадии не проявляются. Показанные животные являются репрезентативными по меньшей мере для 12 животных каждого генотипа. Фиг. 5В. Выделение FACS популяций с HFSC-припухлостью у мышей *Mpr1*+/+ по сравнению с мышами *Mpr1*fl/fl с последующим вестерн-блоттингом показывает успешную делецию белка *Mpr1* в нише стволовых клеток. β -актин является контролем нагрузки. Фиг. 5С. Анализ с помощью планшет-ридера на активность Ldh в отсортированных популяциях HFSC показывает повышенную активность в *Mpr1*fl/fl HFSC по сравнению с *Mpr1*+/+ HFSC. Каждая полоска представляет средний сигнал для каждого генотипа, где $n=9$ мышей, объединены из 3 независимых экспериментов. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный t-тест, $p<0,05$. Фиг. 5D. Гистология на коже WT против кожи с делецией *Mpr1* показывает индукцию анагена в отсутствие *Mpr1*. Масштабная полоска обозначает 100 микрометров. Количественное определение фенотипа справа показывает процент дорсальных фолликулов в телогене, при переходе от телогена к анагену и в анаген у мышей *Mpr1*+/+ по сравнению с мышами *Mpr1*fl/fl ($n=250$ фолликулов от 3 мышей на генотип). Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный t-тест, $p<0,05$. Фиг. 5Е. Иммуногистохимическое окрашивание Ki-67, маркера пролиферации, который активен только в HFSC в начале нового цикла роста волос, присутствует только в *Mpr1*fl/fl HFSC через 8,5 недель, что согласуется с их ускоренным вступлением в новый цикл роста волос. Фосфо-S6, другой маркер, который активен только в HFSC в начале нового цикла роста волос, присутствует только в *Mpr1*fl/fl HFSC. Окрашивание на Sox9 показывает, что HFSC присутствуют в нише с удаленным *Mpr1*. Изображения сняты с 60-кратным увеличением. Фиг. 5F. Удаление *Mpr1* у мышей, несущих аллель *Lgr5CreER*, демонстрирует сильную индукцию цикла роста волос. Обратите внимание, что красные прямоугольники указывают на области роста новых волос. Результаты являются репрезентативными по меньшей мере для 9 животных на генотип. Фиг. 5G. Количественная оценка пигментации в указанных генотипах по трем независимым пометам ($n=5$ мышей на генотип).

Фиг. 6А-6D показывают эффекты долгосрочной делеции *Mpr1* в HFSC. Фиг. 6А. Через шесть месяцев после начала делеции *Mpr1* в HFSC (*K15CrePR*; *Mpr1*fl/fl) у мышей, у которых отсутствует *Mpr1*, не

наблюдается вредных эффектов, измеряемых по циклу роста волос (слева), патологии (в середине, Н и Е) или окрашиванию для HFSC (справа, Sox9). Масштабная полоска обозначает 100 микрометров на средней панели и 50 мкм на правой панели. Изображения являются репрезентативными по меньшей мере для 12 животных на генотип. Фиг. 6B. Чтобы продемонстрировать, что делеция *Mpr1* специфически стимулирует пролиферацию у HFSC, мы использовали *K15CrePR; Ldh^{fl/fl}* мышей, несущих аллель *lox-stop-lox-Tomato*, чтобы посмотреть на *K15+* HFSC и пролиферацию с делецией *Mpr1* и без нее (слева). Кроме того, мы использовали *ires-GFP* в аллеле *Lgr5CreER* для окрашивания *Ki-67* и *GFP* и искали совместную локализацию с делецией *Mpr1* и без нее (справа). Белые скобки отмечают область припухлости. Масштабные полоски обозначают 20 микрометров. Фиг. 6C. Делеция *Mpr1* у мышей, несущих аллель *Lgr6CreER*, не обнаруживает преждевременной индукции цикла роста волос. Фиг. 6D. Анализ активности *Ldh* на отсортированных HFSC, полученных от контрольных мышей или мышей с *Lgr6CreER*-опосредованной делецией *Mpr1*, показал повышенную активность в клетках, лишенных *Mpr1*. $n=6$ мышей на генотип, объединенных из 2 независимых экспериментов. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный *t*-тест, $p<0,05$.

Фиг. 7A-7D показывают, что фармакологическое ингибирование *Mpr1* способствует активации HFSC. Фиг. 7A. У животных, получавших местную терапию UK-5099 (20 мкМ), наблюдается пигментация и рост волос, что указывает на вхождение в анаген после 8 дней лечения. Полный анаген, на который указывает полное покрытие волосами, достигается после 14 дней лечения. Мыши, обработанные местно контрольным растворителем, не показывали ни пигментации, ни роста волос даже после 12 дней лечения. Справа, патология кожи, показывающая, что животные UK-5099 входят в ускоренный анаген через 8 недель, что типично для снижения роста фолликула и утолщения подкожной клетчатки, в то время как животные, обработанные с контрольным растворителем, не показали ничего и остались в телогене. Представленные изображения являются репрезентативными по меньшей мере для 14 мышей из 7 независимых экспериментов. Масштабная полоска обозначает 100 микрометров. Фиг. 7B. График, показывающий время до наблюдаемого фенотипа у мышей в сравнении с мышами, обработанными UK-5099. $n=6$ мышей на состояние. Показано как среднее $\pm$ SEM. Фиг. 7C. Анализ активности фермента *Ldh* в эпидермисе показывает сильную активность у HFSC с контрольным растворителем и у животных, обработанных UK-5099. Активность фермента *Ldh* также наблюдается в межфолликулярном эпидермисе животных, обработанных UK-5099. Активность *Ldh* обозначена пурпурным окрасом; розовый цвет представляет собой ядерный быстрый красный контраст. Масштабная полоска обозначает 50 микрометров. Фиг. 7D. Метаболический анализ лактата у HFSC, выделенных из кожи, обработанной UK-5099, в течение 48 часов. Каждая полоска представляет средний сигнал для каждого условия, где $n=9$ мышей, объединенных из 3 независимых экспериментов. Показано как среднее $\pm$ SEM. Был проведен парный *t*-тест, $p<0,05$.

Фиг. 8 показывает влияние на продуцирование лактата определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в данном документе.

Фиг. 9 показывает влияние на продуцирование лактата определенного ингибитора *Mpr1*, описанного в данном документе.

Фиг. 10 показывает расчет EC50 для UK5099 и JXL020.

Фиг. 11 показывает, что ингибиторы *Mpr1* настоящего изобретения вызывают рост волос.

Фиг. 12 показывает влияние на продуцирование лактата определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в данном документе.

Фиг. 13 показывает влияние на общее количество клеток определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованное к обработке ДМСО.

Фиг. 14 показывает влияние на продуцирование клеточного лактата определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованных к обработке ДМСО.

Фиг. 15 показывает влияние на общее количество клеток определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованное к обработке ДМСО.

Фиг. 16 показывает влияние на продуцирование клеточного лактата определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованных к обработке ДМСО.

Фиг. 17 показывает влияние на общее количество клеток определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованное к обработке ДМСО.

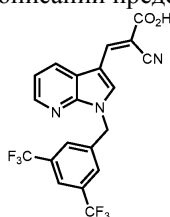
Фиг. 18 показывает влияние на продуцирование клеточного лактата определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованных к обработке ДМСО.

Фиг. 19 показывает влияние на общее количество клеток определенных ингибиторов *Mpr1*, описанных в настоящем документе, нормализованное к обработке ДМСО.

Фиг. 20 показывает роль МРС в окислении пирувата до ацетилкофермента А.

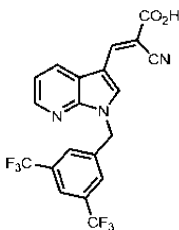
Подробное описание изобретения

В определенных аспектах в настоящем описании представлено соединение формулы

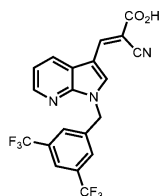


или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой соединение формулы



В определенных вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения



В определенных аспектах в настоящем описании представлен способ стимулирования роста волос или лечения состояний или расстройств роста волос, таких как облысение или алоpecia, включающие введение пациенту соединения, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления ингибитор MPC или MPO представляет собой соединение настоящего изобретения.

Обсуждение.

Многочисленные исследования выявили уникальные сигнатуры экспрессии генов в стволовых клетках волосяного фолликула (HFSC) по сравнению с другими клетками фолликула или клетками межфолликулярного эпидермиса. Многие из этих сигнатур регулируются транскрипционными факторами, которые, как было позже показано, играют важную роль в гомеостазе HFSC.

Лактатдегидрогеназа чаще всего кодируется у млекопитающих генами *Ldha* и *Ldhb*, белковые продукты которых образуют гомо- или гетеротетрамеры для катализа NADH-зависимого восстановления пирувата в лактат и NAD⁺-зависимого окисления лактата в пируват. Методом иммуноокрашивания было обнаружено, что *in situ* покоящиеся HFSC обогащены *Ldha* (телоген) (фиг. 1A), и выполнение иммуногистохимического окрашивания (ИНС) антителом, которое распознает как *Ldha*, так и *Ldhb*, показало, что только *Ldha*, по-видимому, локализована в нише HFSC (фиг. 2A).

ИНС-анализ также показал, что экспрессия *Ldha* преобладает в HFSC (Sox9⁺) на трех стадиях цикла роста волос (фиг. 1A). Соответственно, иммуноблоттинг лизатов, полученных из отсортированных клеток, показал сильную экспрессию *Ldha* в базальных HFSC (α 6HiCD34⁺) и супрабазальных (α 6LoCD34⁺) популяциях HFSC по отношению к общему эпидермису (фиг. 1B) (стратегия сортировки представлена на фиг. 2B).

Чтобы определить, коррелируют ли паттерны экспрессии *Ldha* с активностью фермента *Ldh*, для оценки уровня активности *Ldh in situ* использовали колориметрический ферментативный анализ. Обычно проводимый на белковых лизатах или аликвотах с помощью планшет-ридера, анализ активности *Ldh* был адаптирован для работы *in situ* на срезах замороженной ткани. Следует отметить, поскольку в анализах активности *Ldh in situ* и *in vitro* используется избыточное количество субстрата (лактата), результаты этих анализов отражают максимальный уровень активности *Ldh*, а не активность в стационарном состоянии.

Применение этого анализа к образцам кожи продемонстрировало, что уровень максимальной активности *Ldh* был значительно выше в HFSC, что согласуется с паттерном экспрессии *Ldha* (фиг. 1C). Кроме того, активность *Ldh* была повышена в HFSC в течение всего цикла роста волос (фиг. 1C). В качестве контроля анализы, проводимые без ферментативного субстрата (лактата) или на ткани, обработанной кислотой, дали нулевую активность (фиг. 2C). Для дальнейшей валидации этих результатов мы сор-

тировали эпидермальные популяции, получали клеточные лизаты на отсортированных клетках и проводили аналогичный колориметрический ферментативный анализ на отсортированных клеточных лизатах, который также показал повышенную активность Ldh в HFSC (фиг. 1D). Чтобы лучше охарактеризовать метаболизм HFSC, мы выполнили метаболомный анализ на отсортированных популяциях кожи мыши методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) (фиг. 1е). Несколько гликолитических метаболитов, в том числе глюкозо/фруктозо-6-фосфат, фруктозо-бисфосфат, дигидроксиацетон-фосфат, 3-фосфоглицерат и лактат, были обычно выше в HFSC по сравнению с общим эпидермисом в трех независимых экспериментах (выделенных от разных мышей в разные дни). Наоборот, большинство метаболитов цикла ТКК не отличались друг от друга между эпидермисом и HFSC (фиг. 1E). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что хотя все клетки в эпидермисе широко используют цикл ТКК для генерации энергии, HFSC также обладают повышенной экспрессией Ldh, активностью Ldh и гликолитическим метаболизмом.

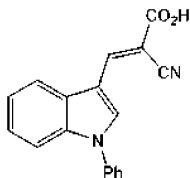
Таким образом, измерение метаболизма во всем цикле роста волос позволит зафиксировать любые динамические изменения, происходящие в HFSC, которые коррелируют с активацией или покоем. Анализ данных РНК-секвенирования из HFSC, выделенных во время телогена или перехода телогена в анаген, продемонстрировал не только то, что Ldh является преобладающей изоформой Ldh, экспрессируемой в HFSC (фиг. 3), но также индуцируется во время перехода телогена в анаген (фиг. 3A и 3B (NIH-GEOGSE67404 и GSE51635)). Чтобы подтвердить, что клетки, анализируемые с помощью РНК-секвенирования, действительно были либо в телогене, либо в переходе телогена в анаген, были оценены важные маркеры этого перехода, включая пути Shh и Wnt (Gli1, 2, 3; Lef1, Axin1, Axin2, Ccnd1) а также маркеры пролиферации (Ki-67, Pcna и Sox4) (фиг. 4A).

Анализ активности Ldh *in vitro* в отношении лизатов из отсортированных HFSC выявил умеренную индукцию активности Ldh, коррелирующую с переходом телогена в анаген (фиг. 3D). Стадийность цикла роста волос подтверждали иммуноокрашиванием Ki-67 для определения активации HFSC (фиг. 4B). Кроме того, результаты измерения метаболитов в стационарном состоянии, извлеченных из отсортированных HFSC, показали увеличение лактата в HFSC, когда они переходят от телогена к переходу телогена в анаген, а затем снова уменьшаются в анагене, когда HFSC возвращаются в состояние покоя (фиг. 3E).

Чтобы определить, может ли индукция продуцирования лактата влиять на активацию HFSC или цикл роста волос, мы скрещивали животных K15CrePR с теми, которые имели фланкированные loxP-сайты для митохондриального переносчика пирувата 1 (Mpc1) (K15CrePR;Mpc1^{fl/fl}). Mpc1, как гетеродимер с Mpc2, образует митохондриальный переносчик пирувата MPC, транспортер на внутренней мембране митохондрий, необходимый для проникновения пирувата в митохондрии. Было показано, что потеря функции Mpc1 стимулирует выработку лактата за счет усиления превращения пирувата в лактат с помощью Ldh. Кроме того, ингибирование MPC приводит к снижению окисления митохондриального пирувата (MPO) до ацетил-кофермента А (фиг. 20).

У животных с делецией Mpc1 в HFSC мы наблюдали сильное ускорение циклов роста вентральных и дорсальных волос со всеми типичными признаками перехода телогена в анаген (фиг. 5A) (n=12 пар однопометников). Обработанные мифепристоном животные K15CrePR;Mpc1^{fl/fl} были единственными, у кого были обнаружены какие-либо признаки дорсального анагена к 70 дню. Вестерн-блоттинг на отсортированных HFSC подтвердил потерю белка Mpc1 (фиг. 5B). Важно, что очищенные HFSC, лишенные Mpc1, показали сильную индукцию активности Ldh (фиг. 5C). Количественная оценка цикла роста дорсальных волос на трех парах однопометников показала сильную индукцию анагена у кожи спины, лишенной Mpc1 (фиг. 5D, справа), и гистология показала, что индукция анагена была нормальной с типичным подкожным расширением (фиг. 5D). Иммуноокрашивание продемонстрировало индукцию в Mpc1-null HFSC различных маркеров активации цикла роста волос, таких как Ki-67 и pS6, в то время как экспрессия Sox9 не изменялась (фиг. 5E). Долгосрочная делеция Mpc1 не приводила к aberrantным фолликулам или истощению HFSC, что оценивалось по патологии и окрашиванию на Sox9 (фиг. 6A). Кроме того, делеция Mpc1 с Lgr5CreER показала очень похожий фенотип как и делеция с K15CrePR (фиг. 5F и 5G), подтверждая тот факт, что делеция этого белка в HFSC приводит к их активации (n=12 пар однопометников). Наконец, иммунофлуоресценция для Ires-GFP трансгена Lgr5CreER вместе с Ki-67 и отслеживание линии происхождения с помощью мышей K15CrePR; Mpc1^{fl/fl}; Isl-Tomato также продемонстрировали, что HFSC действительно пролиферативны после индукции делеции Mpc1 тамоксифеном или мифепристоном (фиг. 6B).

UK-5099 (также обозначаемый здесь как JXL001) является хорошо известным фармакологическим ингибитором митохондриального переносчика пирувата и, как известно, стимулирует выработку лактата в результате различных условий. UK-5099 имеет следующую структуру:



Местное лечение животных в телогене (день 50) с помощью UK-5099 привело к сильному ускорению цикла роста волос, а также к незначительной гиперпролиферации межфолликулярного эпидермиса (фиг. 7A). Количественная оценка цикла роста волос у по меньшей мере 6 пар животных (носитель против UK-5099) показала сильное ускорение цикла роста волос всего за 6-9 дней (фиг. 7B). Подобно генетической делеции *Mpr1*, фармакологическая блокада митохондриального переносчика пирувата с помощью UK-5099 в течение 48 ч во время телогена способствовала увеличению активности *Ldh* в HFSC и межфолликулярном эпидермисе, что согласуется с повышенной способностью продуцировать лактат (фиг. 1C). Наконец, метаболический анализ показал, что местное применение UK-5099 увеличивает общие уровни лактата в отсортированных HFSC (фиг. 7D).

Были синтезированы соединения, которые могут локально стимулировать повышение уровня лактата и, следовательно, запускать цикл роста волос.

Соединения обычно получают взаимодействием соответствующих альдегидов, например, для JXL001, 1-фенилиндол-3-карбоксальдегид с этилцианоацетатом в присутствии 40% водн. L-пролин дает исключительно E-изомер этил-2-циано-3-(1-фенилиндол-3-ил)пропеноата, например JXL004. Гидролиз сложного эфира с мягким гидроксидом лития дает is-изомер кислоты, например JXL001. Все остальные соединения были получены аналогичными методами с использованием конкретного альдегида. Два гетероциклических соединения, JXL023 и JXL024, были получены путем конденсации 1-фенилиндол-3-карбоксальдегида с тиазолидин-2,4-дионом и 2-иминотиазолидин-4-оном. Структуры всех соединений были определены с использованием обычных методов органической химии, особенно спектров ЯМР протонов, углерода и фтора в сильных полях. В частности, измерения сочетания $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ показали, что все соединения имеют E-стереохимию относительно ключевой двойной связи углерод-углерод.

Чтобы определить, могут ли эти соединения стимулировать выработку клеточного лактата, мы обрабатывали культивируемые эпителиальные клетки такими соединениями и измерили уровни лактата в культуральной среде с использованием базового анализатора Nova Biomedical BioProfile. Вкратце, культивируемые эпителиальные клетки обрабатывали ДМСО, UK-5099 (также называемым JXL001) или некоторыми из иллюстративных соединений, раскрытых здесь, в течение 24-30 ч, и уровни лактата в среде измеряли и нормализовали по числу клеток и продолжительности эксперимента, чтобы определить скорость продуцирования клеточного лактата (нмоль лактата, млн клеток, час). Результаты, приведенные на фиг. 8 и 9.

Скорость продуцирования лактата обработанных клеток показана на фиг. 8. Как и ожидалось, поскольку они являются аналогами UK-5099, большинство новых испытанных соединений увеличивали продукцию лактата. Отдельный анализ проводили для расчета EC_{50} некоторых соединений, как показано на фиг. 10.

Чтобы определить эффективность соединений в цикле роста волос, мышей брили в постнатальный день 50 и местно обрабатывали соединением, раскрытым в настоящем документе, суспендированным в лосьоне через день в течение 3 недель. Как показано на фиг. 11, все аналоги, которые показали способность стимулировать продуцирование лактата в анализе *in vitro*, были также способны стимулировать рост волос в течение 2 недель.

Для использования в способе этого изобретения активные соединения могут быть даны сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно от 0,5 до 90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения могут также обеспечиваться перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и испытаны *in vivo* различные полимерные устройства с медленным высвобождением для контролируемой доставки лекарств, включая белковые биофармацевтические препараты. Различные биосовместимые полимеры (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, могут быть использованы для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном целевом месте.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсического эффекта для пациента.

Выборный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения или комбинации соединений или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого(ых) соединения(ий), продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с применяемыми конкретным(ыми) соединением(ями), возраст, пол, вес, состояние,

общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в данной области медицины.

Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области, может легко определять и назначать терапевтически эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать прием доз фармацевтической композиции или соединения с уровнем ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество соединения, которое является достаточным для достижения желаемого терапевтического эффекта. Обычно считается, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от веса, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать, но не ограничиваются ими, тяжесть состояния пациента, расстройство, которое лечат, стабильность соединения и, если желательно, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением изобретения. Большая общая доза может быть доставлена путем многократного введения агента. Методы определения эффективности и дозировки известны специалистам в данной области (Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882, включенный сюда посредством ссылки).

В общем, подходящая суточная доза активного соединения, используемого в способе изобретения, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от описанных выше факторов.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения активное соединение может вводиться два или три раза в день. В предпочтительных вариантах осуществления активное соединение будет вводиться один раз в день.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности людей, и другие млекопитающие, такие как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, кошки и собаки; птицы; и домашние животные в целом.

В определенных вариантах осуществления соединения изобретения могут вводиться отдельно или совместно с терапевтическим агентом другого типа.

Настоящее описание включает использование фармацевтически приемлемых солей соединений изобретения в способе настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, соли алкила, диалкила, триалкила или тетраалкиламмония. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, L-аргинин, бенентамин, бензатин, бетаин, гидроксид кальция, холин, динол, диэтанолламин, диэтиламин, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламин, этилендиамин, N-метилглуксамин, гидрабамин, 1H-имидазол, литий, L-лизин, магний, 4-(2-гидроксиэтил)морфолин, пиперазин, калий, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидин, натрий, триэтанолламин, трометамин и соли цинка. В определенных вариантах осуществления предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, соли Na, Ca, K, Mg, Zn или других металлов. В некоторых вариантах предполагаемые соли изобретения включают, но не ограничиваются ими, 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, 2-оксоглутаровую кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, уксусную кислоту, адипиновую кислоту, L-аскорбиновую кислоту, L-аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, (+)-камфорную кислоту, (+)-камфор-10-сульфокислоту, каприновую кислоту (декановая кислота), капроновую кислоту (гексановая кислота), каприловую кислоту (октановая кислота), угольную кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, цикламиную кислоту, додецилсульфоновую кислоту, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, d-глюкогептоновую кислоту, d-глюконовую кислоту, d-глюкуроновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, бромистоводородную кислоту, соляную кислоту, изомаляновую кислоту, молочную кислоту, лактобионовую кислоту, лауриновую кислоту, малеиновую кислоту, L-яблочную кислоту, малоновую кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, палмовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, L-пироглутаминовую кислоту, салициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, L-винную кислоту, тиоциановую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту и соли ундециленовой кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот также могут существовать в виде различных сольватов, таких как вода, метанол, этанол, диметилформамид и тому подобное. Могут быть также приготовлены смеси таких сольватов. Источником такого сольвата может быть растворитель кристаллизации, принадлежащий к растворителю для приготовления или кристаллизации или случайный для такого растворителя.

Определения.

Если в настоящем документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в данной заявке, должны иметь значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с химическими методами, методиками культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, клеточной и онкологической биологии, нейробиологии, нейробиологии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, фармакологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, описанными здесь, хорошо известны и широко используются в данной области.

Способы и методики настоящего описания, как правило, выполняются, если не указано иное, в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании; см., например "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.", W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); и Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Химические термины, используемые в данном документе, если здесь не указано иное, используются в соответствии с общепринятым применением в данной области техники, как показано в "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все вышеперечисленное и любые другие публикации, патенты и опубликованные патентные заявки, упомянутые в данной заявке, специально включены в настоящий документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая его конкретные определения, будет иметь преимущественную силу.

"Пациент", "субъект" или "индивидуум" используются взаимозаменяемо и относятся к человеку или животному, не являющемуся человеком. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, сельскохозяйственных животных (включая коров, свиней и т. д.), домашних животных (например, собак, кошек и т. д.) и грызунов (например, мышей и крыс).

"Применение" или "введение" субстанции, соединения или агента субъекту может быть осуществлено с использованием одного из множества способов, известных специалистам в данной области. Например, соединение можно вводить внутривенно, артериально, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, подкожно, через глаза, сублингвально, перорально (путем приема внутрь), интраназально (путем ингаляции), внутриспинально, интрацеребрально и транскутанеально (путем абсорбции, например, через кожный проток). Соединение также можно соответствующим образом вводить с помощью пероральных или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например пластырей и насосов, или составов, которые обеспечивают пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

Подходящие способы введения вещества, соединения или агента субъекту также будут зависеть, например, от возраста и/или физического состояния субъекта и химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимости, усвояемости, биодоступности, стабильности и токсичности). В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят перорально, например, субъекту путем приема внутрь. В некоторых вариантах осуществления перорально вводимое соединение или агент находится в составе с пролонгированным или замедленным высвобождением или вводится с использованием устройства для такого медленного или пролонгированного высвобождения.

Используемое здесь выражение "совместное введение" относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических агентов, так что второй агент вводят, в то время как ранее введенный терапевтический агент все еще эффективен в организме (например, два агента являются одновременно эффективными у пациента, что может включать синергетическое действие двух агентов). Например, различные терапевтические соединения могут вводиться либо в одной и той же композиции, либо в отдельных композициях, одновременно или последовательно. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических агентов.

"Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" представляет собой количество, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый терапевтический эффект. Полный терапевтический эффект необязательно возникает при введении одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. Точное эффективное количество, необходимое для субъекта, будет зависеть, например, от размера, состояния здоровья и возраста субъекта, а также от характера и степени состояния, подвергаемого лечению, такого как рак или MDS. Специалист может легко определять эффективное количество для данной ситуации путем рутинных экспериментов.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" или "соль" используется здесь для обозначения соли присоединения кислоты или соли присоединения основания, которая подходит для лечения пациентов или совместима с ним.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты" означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любых основных соединений, представленных формулой I или II. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают соляную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут быть образованы моно- или дикислотные соли, и такие соли могут существовать в гидратированной, сольватированной или практически безводной форме. Как правило, кислотно-аддитивные соли соединений формулы I или II более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно демонстрируют более высокие температуры плавления по сравнению с их формами свободного основания. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области. Другие фармацевтически приемлемые соли, например оксалаты, могут быть использованы, например, для выделения соединений формулы I или II для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль.

Термин "фармацевтически приемлемая основная аддитивная соль", как он используется здесь, означает любую нетоксичную аддитивную соль органического или неорганического основания любых кислотных соединений, представленных формулой I или II, или любых их промежуточных соединений. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают гидроксид лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области.

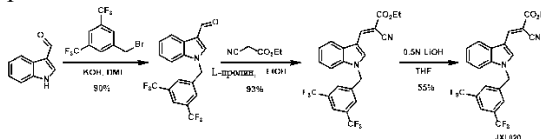
Используемые здесь термины "Log растворимости", "LogS" или "logS" используются в данной области для количественного определения растворимости соединения в воде. Растворимость соединения в воде значительно влияет на его характеристики всасывания и распределения. Низкая растворимость часто сопровождается плохой абсорбцией. Значение LogS представляет собой логарифм с отделенной единицей (основание 10) растворимости, измеренной в моль/литр.

Примеры

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

Пример 1. Приготовление примерных соединений.

Экспериментальные подробности синтеза JXL020



К раствору индол-3-карбоксальдегида (3 ммоль, 435 мг) в сухом ДМФ (6 мл) добавляли 3,5-бис(трифторметил)бензилбромид (1,2 экв., 3,6 ммоль, 660 мкл) и KOH (1,2 экв. 3,6 ммоль, 200 мг) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 21°C в течение 2 ч. После завершения реакции, показанного с помощью ТСХ, в реакционную пробирку добавляли воду (6 мл). Реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (15 мл×3). Объединенный органический слой сушили сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (гексаны/EtOAc=8:1) с получением желаемого продукта, выход: 90%, 1001,7 мг.

К раствору 1-(3,5-бис(трифторметил)бензил)-1H-индол-3-карбальдегида (1 ммоль, 371 мг) в этаноле (1 мл) добавляли этил 2-цианоацетат (1,3 экв., 1,3 ммоль, 140 мкл) и L-пролин (40 мол.%, 0,4 ммоль, 58 мг). Реакционную смесь перемешивали при 21°C в течение 12 ч и постепенно осаждали желтое твердое вещество. После завершения реакции в реакционную пробирку добавляли ледяную воду (2 мл). Твердое вещество отделяли фильтрованием через воронку Бюхнера, промывали водой (2 мл×3) и сушили, получая желаемый продукт, выход: 93%, 433 мг.

К раствору (E)-этил 3-(1-(3,5-бис(трифторметил)бензил)-1H-индол-3-ил)-2-цианоакрилата (0,21 ммоль, 100 мг) в ТГФ (2 мл) добавляли 0,5N. раствор LiOH (3 экв., 0,4 ммоль, 0,8 мл). Реакционную смесь перемешивали при 21°C в течение 1 ч. После завершения реакции, показанного с помощью ТСХ, ТГФ выпаривали. Добавляли по каплям концентрированную HCl для подкисления реакционной смеси до тех пор, пока pH не становился ниже 1, при этом выпадало в осадок желтое твердое вещество. К реакционной смеси добавляли ледяную воду (5 мл) и твердое вещество отделяли фильтрованием через воронку Бюхнера и промывали водой (5 мл×3). После высушивания в вакууме твердое вещество промывали 2 мл смеси растворителей (гексаны/EtOAc=5:1) от 5 до 10 раз и контролировали с помощью ТСХ до исчезно-

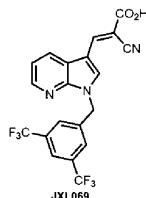
вения неполярных примесей (неполярное соединение представляло собой продукт ретро-альдольной конденсации, который можно извлечь из фильтрата). Наконец, чистота продукта была проверена с помощью ЯМР, выход: 55%, 52 мг.

(Е)-3-(1-(3,5-бис-(Трифторметил)бензил)-1Н-индол-3-ил)-2-цианоакриловая кислота (JXL020).

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,37 (уш. с, 1H), 8,75 (с, 1H), 8,48 (с, 1H), 7,99 (м, 4H), 7,65 (с, 1H), 7,28 (м, 2H), 5,83 (с, 2H).

¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ 164,7, 145,7, 140,3, 136,3, 134,8, 131,1, 130,8 (q, J=31,1 Гц), 128,9, 128,7, 127,9, 124,8, 124,3, 122,9 (q, J=273,4 Гц), 122,2, 119,3, 118,3, 95,6, 49,2.

Следующее соединение было синтезировано способом, аналогичным описанному для JXL020: JXL069.



(Е)-3-(1-(3,5-бис-(Трифторметил)бензил)-1Н-пирроло[2,3-*b*]пиридин-3-ил)-2-цианоакриловая кислота (JXL069).

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,85 (с, 1H), 8,47 (м, 3H), 8,09 (с, 2H), 8,04 (с, 1H), 7,35 (дд, J=7,1, 4,6 Гц, 1H), 5,84 (с, 2H).

¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ 185,9, 164,6, 147,8, 146,1, 145,5, 141,0, 135,2, 131,0 (q, J_{c-f}=32,8 Гц), 129,4, 126,9, 123,6 (q, J_{c-f}=274,0 Гц), 122,3, 120,1, 119,1, 118,2, 97,1, 47,8.

Пример 2. Лечение эпителиальных клеток с помощью иллюстративных соединений.

Чтобы определить, могут ли эти соединения стимулировать выработку клеточного лактата, мы обрабатывали культивируемые эпителиальные клетки такими соединениями и измеряли уровни лактата в культуральной среде с использованием базового анализатора Nova Biomedical BioProfile. Вкратце, культивируемые эпителиальные клетки обрабатывали ДМСО, UK-5099 (также называемым JXL001) или некоторыми из иллюстративных соединений, раскрытых здесь, в течение 24-30 ч, и уровни лактата в среде измеряли и нормализовали по числу клеток и продолжительности эксперимента, чтобы определить скорость продуцирования клеточного лактата (нмоль лактата, млн клеток, час).

Скорости выработки лактата обработанными клетками показаны на фиг. 8, 9 и 12. Как и ожидалось, исходя из настоящего описания, поскольку они являются аналогами ТЖ-5099, большинство новых соединений анализировали на увеличение продуцирования лактата. Кроме того, общее количество клеток после обработки аналогами UK-5099 показано на фиг. 13. Большинство соединений переносились клетками. Отдельный анализ проводили для расчета ЕС₅₀ некоторых соединений, как показано на фиг. 10.

Пример 3. In vivo тест иллюстративных соединений.

Чтобы определить эффективность соединений в цикле роста волос, мышей брили на 50 день после родов и через день местно обрабатывали соединением, раскрытым в этом документе, суспендированным в лосьоне через день в течение 2 недель, и фотографировали. Как показано на фиг. 11, все аналоги, которые показали способность стимулировать продуцирование лактата в анализе in vitro, были также способны стимулировать рост волос в течение 2 недель.

Включение признаков путем ссылки.

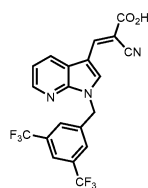
Все публикации, патенты, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, в которой каждая индивидуальная публикация, патент, специфично и индивидуально указана для включения посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые определения в этом документе, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты.

Хотя были обсуждены конкретные варианты осуществления предмета изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Многие варианты изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после рассмотрения этого описания и формулы изобретения ниже. Полный объем изобретения должен быть определен посредством ссылки на формулу изобретения вместе с их полным объемом эквивалентов и описания вместе с такими вариантами.

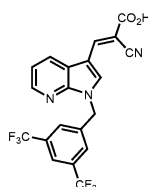
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представляющее собой соединение

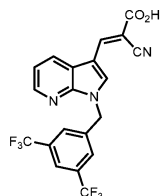


или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Соединение по п.1, где соединение представляет собой



3. Соединение по п.1, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения

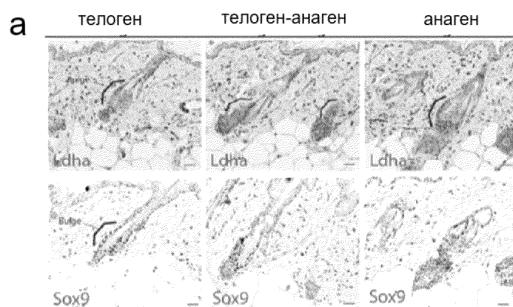


4. Способ стимулирования роста волос или лечения расстройства, влияющего на рост волос, включающий введение пациенту соединения по любому из пп.1-3.

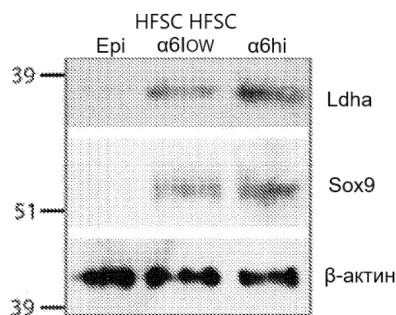
5. Способ по п.4, где способ представляет собой способ стимулирования роста волос.

6. Способ по п.4, где способ представляет собой способ лечения расстройства, влияющего на рост волос.

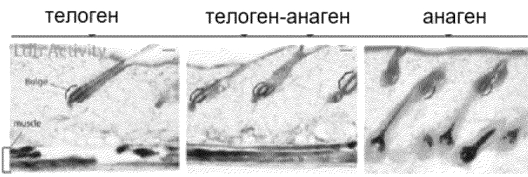
7. Способ по п.6, где расстройством является облысение или алопеция.



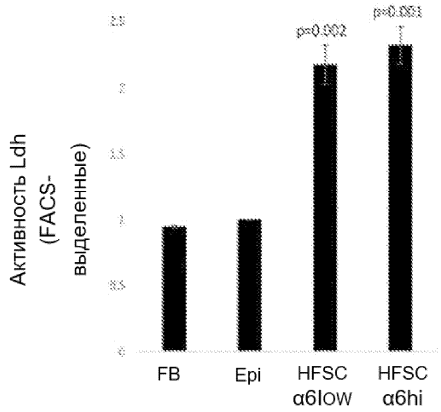
Фиг. 1А



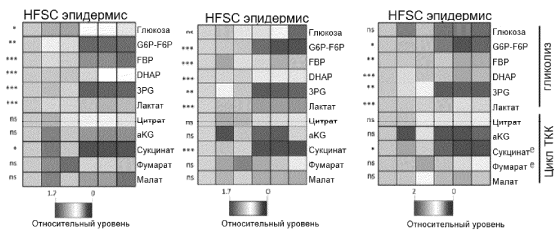
Фиг. 1В



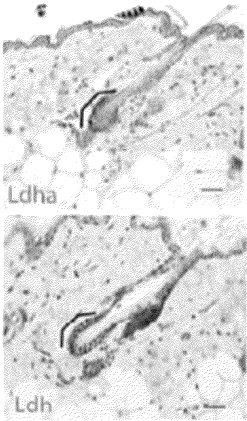
Фиг. 1С



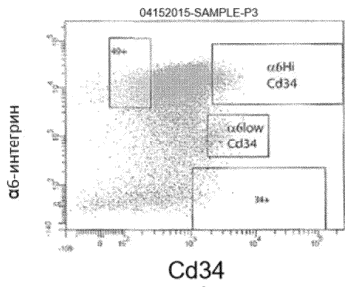
Фиг. 1D



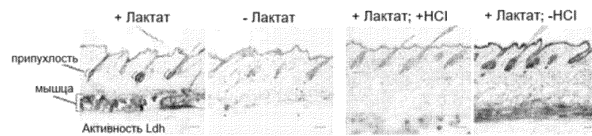
Фиг. 1E



Фиг. 2A



Фиг. 2B



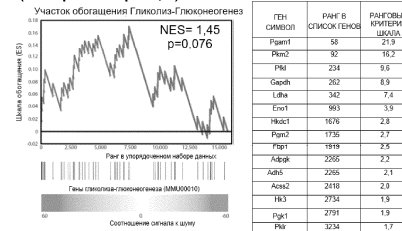
Фиг. 2С

HFSC в телогене по сравнению с тело-ана (РНК-секвенир.)

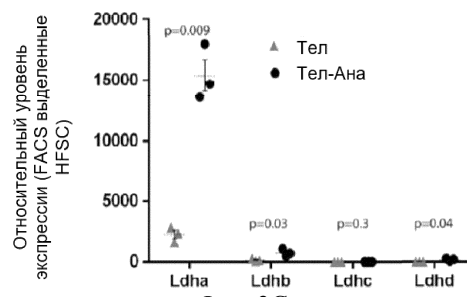


Фиг. 3А

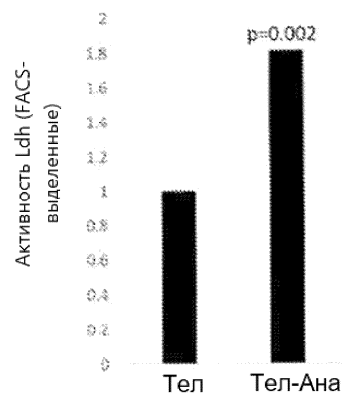
HFSC в телогене по сравнению с тело-ана (микроматрица)



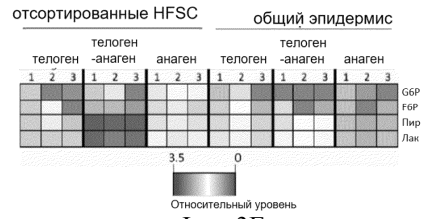
Фиг. 3В



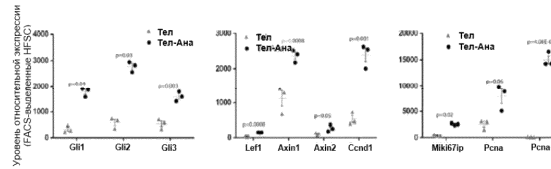
Фиг. 3С



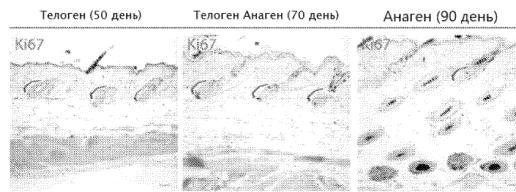
Фиг. 3D



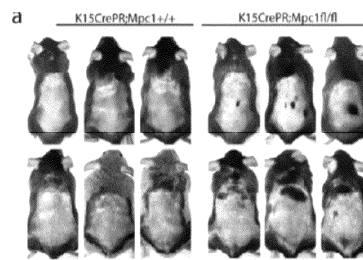
Фиг. 3E



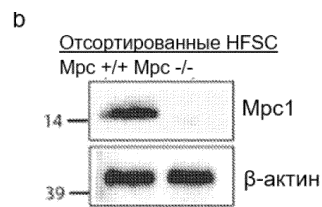
Фиг. 4A



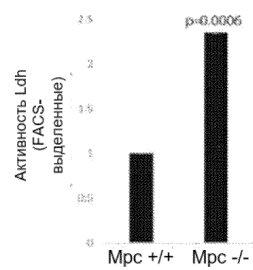
Фиг. 4B



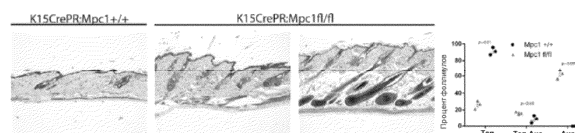
Фиг. 5A



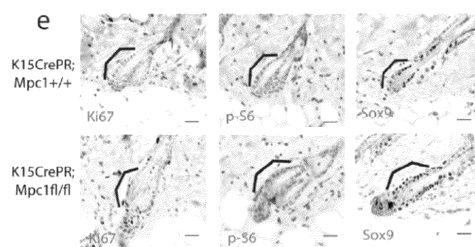
Фиг. 5B



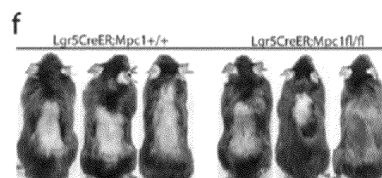
Фиг. 5C



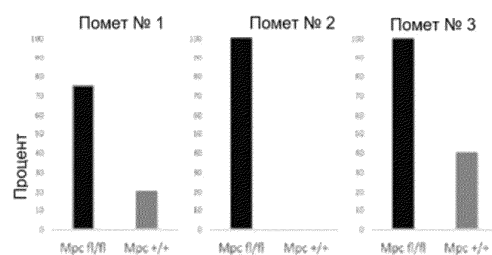
Фиг. 5D



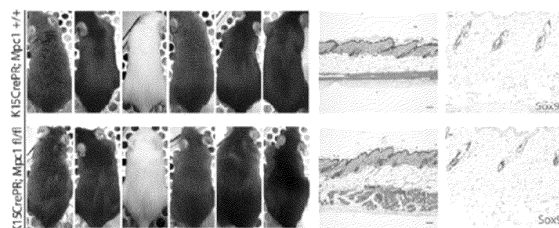
Фиг. 5E



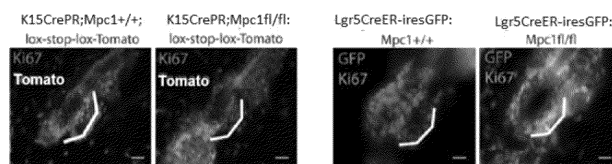
Фиг. 5F



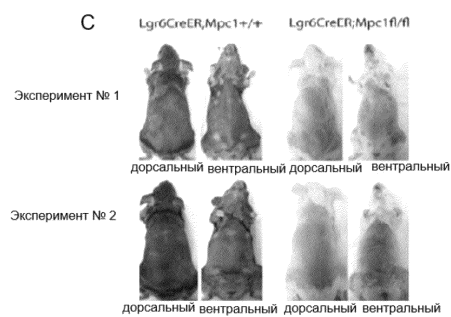
Фиг. 5G



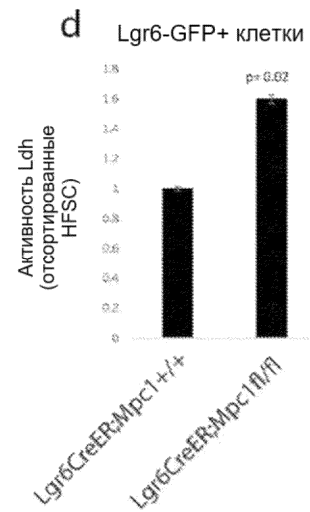
Фиг. 6A



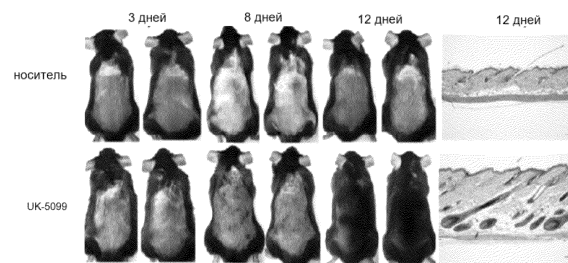
Фиг. 6B



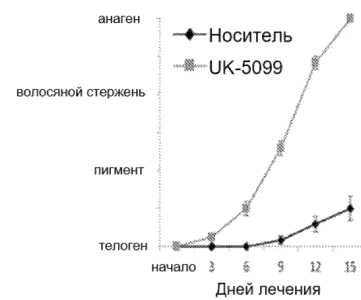
Фиг. 6C



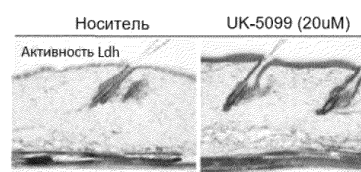
Фиг. 6D



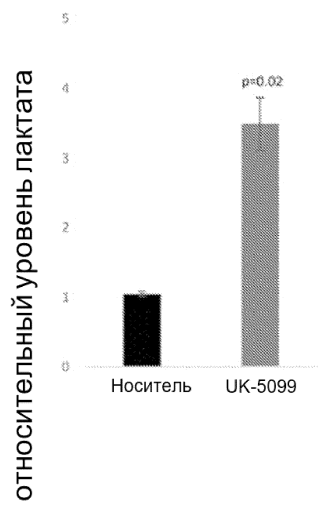
Фиг. 7A



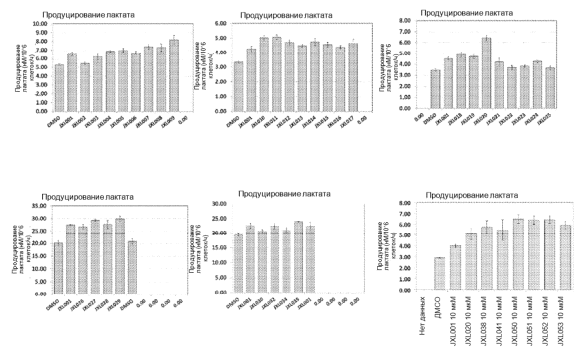
Фиг. 7B



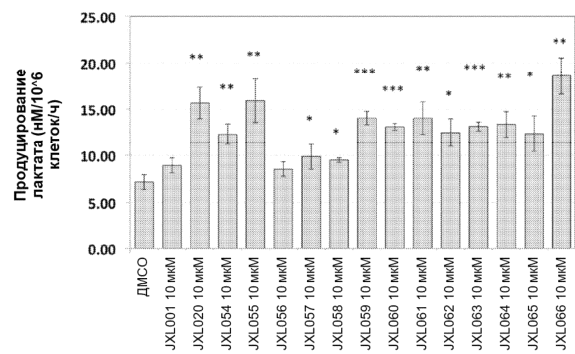
Фиг. 7C



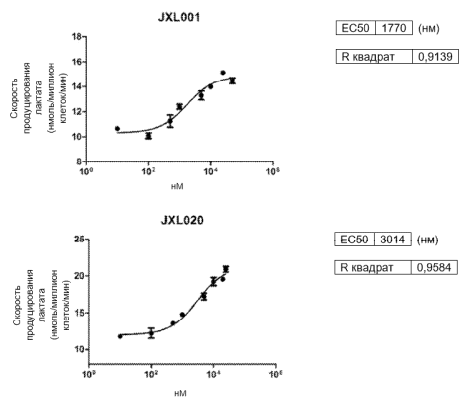
Фиг. 7D



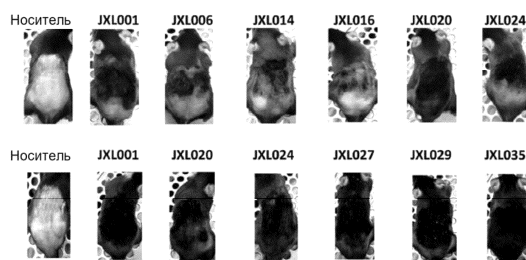
Фиг. 8



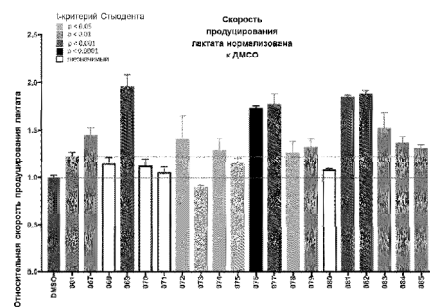
Фиг. 9



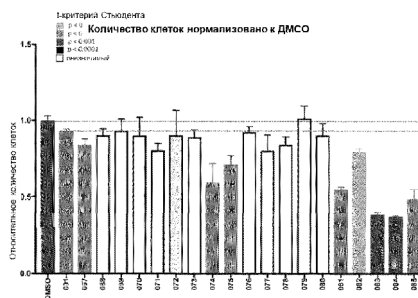
Фиг. 10



Фиг. 11

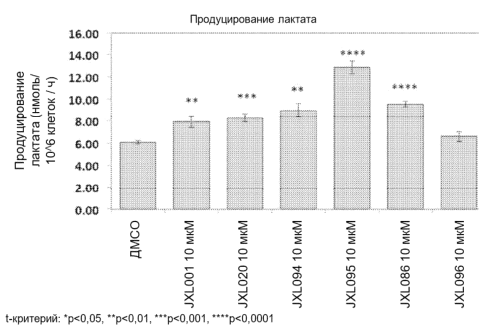


Фиг. 12



Фиг. 13

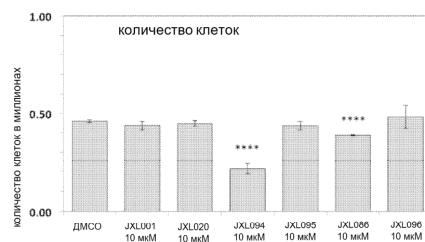
5/31/18 t=30 час 10 мкм лечение



t-критерий: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

Фиг. 14

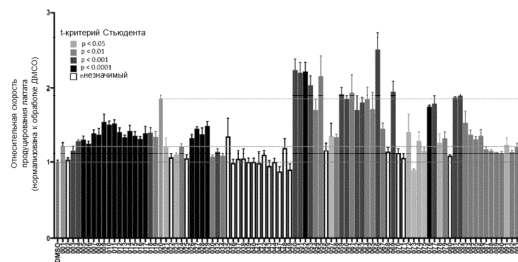
5/31/18 t=30 ч 10 мкм лечение



t-критерий: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

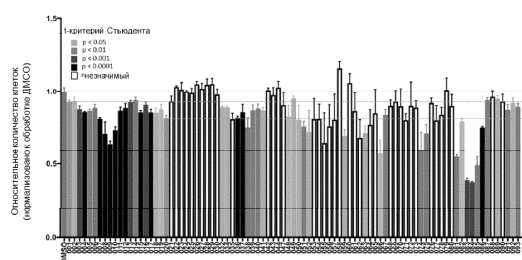
Фиг. 15

Относительный LPR, JXL001-093



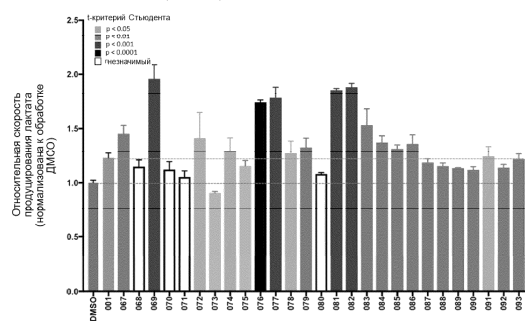
Фиг. 16

Относительное количество клеток, JXL001-093



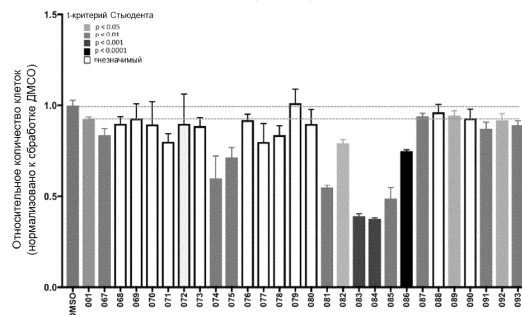
Фиг. 17

Относительный LPR, JXL001, 067-093

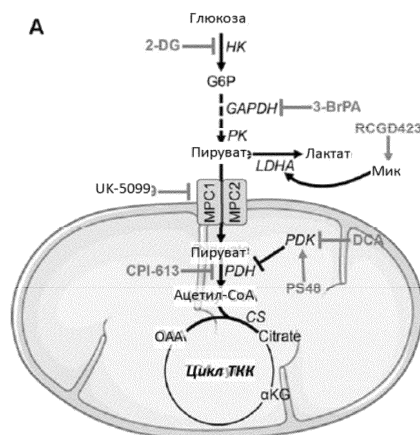


Фиг. 18

Относительное количество клеток, JXL001, 067-093



Фиг. 19



Фиг. 20