



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036700

(51)⁸ C07K 19/00; A61K 8/63; A61Q 19/00; (13) B
C07K 7/08; C07J 73/00; C07K 7/06;
A61K 31/56; A61Q 7/00

(21) 1-2018-04587

(22) 20/05/2016

(86) PCT/KR2016/005405 20/05/2016

(87) WO 2017/159922 21/09/2017

(30) 10-2016-0032988 18/03/2016 KR

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/12/2018 369A

(73) CAREGEN CO., LTD. (KR)

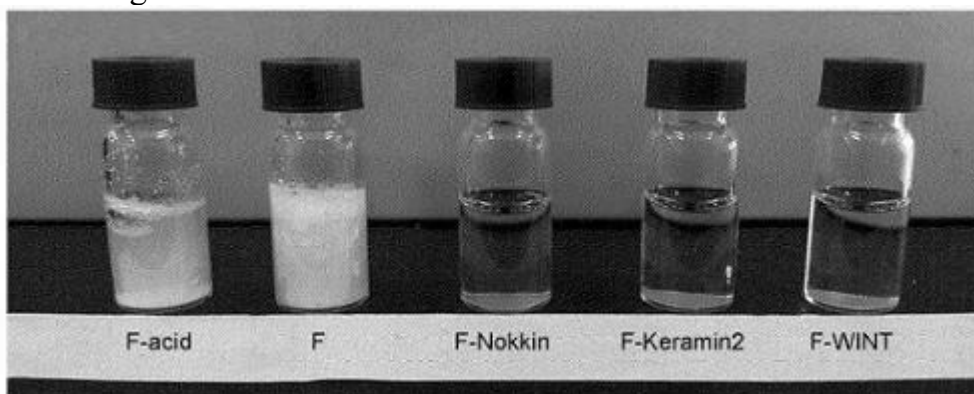
46-38, LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, Republic of Korea

(72) CHUNG, Yong Ji (KR); KIM, Eun Mi (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) THỂ TIẾP HỢP CỦA FINASTERIDE VÀ PEPTIT, DƯỢC PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của finasteride và peptit được liên kết thông qua liên kết cộng hóa trị và dược phẩm hoặc mỹ phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc chứa thể tiếp hợp này. Thể tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc trong đó finasteride và peptit được liên kết thông qua liên kết cộng hóa trị có hoạt tính sinh lý tốt như cải thiện chứng rụng lông tóc, thúc đẩy sự phát triển của lông tóc, thúc đẩy sự phát triển của tế bào, v.v., có độ ổn định trong nước và khả năng thẩm qua da, do đó có thể được sử dụng hiệu quả dưới dạng chế phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc và thúc đẩy sự phát triển của lông tóc.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của finasteride và peptit bằng liên kết cộng hóa trị, và dược phẩm và mỹ phẩm chứa thể tiếp hợp này để ngăn ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nang lông là cơ quan đặc biệt trên da của động vật có vú. Nang lông là phần lõm sâu xuống của biểu bì nguyên thủy, kéo dài vào trong các lớp sâu hơn của da. Ở chân của nang lông có khối tế bào được gọi là nhú nang hoặc nhú bì. Nhú này là cần thiết trong chu kỳ bình thường của nang lông và trong quá trình phát triển của thân lông. Thân lông là cấu trúc có dạng sợi được tạo ra từ các tế bào biểu mô kết dính một cách chặt chẽ được lấp đầy bằng các sợi keratin và các protein gắn kết sợi.

Lông tóc của người lặp lại một cách định kỳ chu kỳ bao gồm các pha phát triển, ngừng phát triển và thoái triển, và đi qua quá trình rụng và tái sinh lông tóc. Chu kỳ phát triển của lông tóc được điều hòa bằng hormon hoặc nhiều yếu tố sinh trưởng. Sự căng thẳng quá mức hoặc sự dinh dưỡng kém có thể làm tăng các pha ngừng phát triển và thoái triển, dẫn đến chứng rụng lông tóc nặng.

Quá trình rụng lông tóc của da đầu được gọi là chứng rụng lông tóc. Chứng rụng lông tóc có thể xảy ra do nhiều yếu tố khác nhau bao gồm các yếu tố môi trường như tiếp xúc với thời tiết, ánh sáng hoặc nhiệt, v.v., và các yếu tố bên trong như bệnh, sự sinh đẻ, sự bài tiết và thay đổi hormon, sự dùng thuốc, các điều kiện dinh dưỡng, v.v.. 5-alpha reductaza là hormon chủ yếu can thiệp vào cơ chế rụng lông tóc (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2008-0077762). 5-alpha reductaza là enzym làm tăng sự tiết bã nhờn bằng cách chuyển hóa testosterone, là một loại androgen, thành dihydrotestosterone (DHT). Trong số các sản phẩm khác nhau phòng ngừa chứng rụng lông tóc và thúc đẩy sự phát triển của lông tóc có bán trên thị trường sản phẩm điều trị chứng rụng lông tóc, có nhiều sản phẩm nhằm ức chế tác dụng của 5-alpha reductaza. Chứng rụng lông tóc cũng có thể xảy ra do dinh dưỡng kém, da đầu khô, căng thẳng, v.v.,

ngoài các phản ứng enzym (Eunju Ryu, et al., The Journal of Korean Society of Design Culture, 18(2), trang 89-100, 2012). Trong trường hợp rụng lông tóc do các nguyên nhân này, chứng rụng lông tóc có thể được ngăn ngừa và sự phát triển của lông tóc có thể được thúc đẩy bằng cách cung cấp dinh dưỡng đầy đủ, thực hiện việc xử lý da đầu và nạp hoặc dùng các chất chống oxy hóa.

Không phụ thuộc vào nguyên nhân của nó, cuối cùng, chứng rụng lông tóc có thể dẫn đến ảnh hưởng lớn về tinh thần, xã hội và giới tính, cùng với sự mất niềm kiêu hãnh và lòng tự tôn. Để điều trị chứng rụng lông tóc, cho đến nay, các chất khác nhau đã được sử dụng làm được chất, nhưng trên thực tế chúng có nhược điểm là quá đắt hoặc chúng thể hiện sự khác biệt cá thể lớn. Ngoài ra, liên quan đến các sản phẩm mỹ phẩm, chiết xuất từ thực vật rẻ hơn nhưng có tác dụng kém hơn đã được sử dụng, nhưng tác dụng là không đáng kể.

Các biện pháp điều trị và giải pháp cho chứng rụng lông tóc đã được thay đổi đáng kể trong một khoảng thời gian dài. Đã có thể che giấu tình trạng hói đầu bằng bộ tóc giả, tóc giả một phần và nối tóc, nhưng điều này không thể tạo ra tóc mới. Ngoài ra, hai được chất hiện có (minoxidil và finasteride) đã biết cho đến nay có thể làm chậm sự rụng lông tóc thêm nữa, nhưng thực sự không thể được sử dụng nhằm mục đích đem lại sự tái sinh nang lông. Ngoài ra, dưới dạng các sản phẩm mỹ phẩm dùng cho tóc, nhiều sản phẩm ngăn ngừa chứng rụng lông tóc bằng cách sử dụng chiết xuất từ thực vật, v.v. đã được phát triển, nhưng rất khó tìm ra các sản phẩm mà có tác dụng tạo ra sự phát triển của lông tóc mới.

Các yếu tố khác nhau có liên quan với nhau trong tiến trình phát triển và thoái hóa của lông tóc. Ví dụ, đã có nhiều báo cáo về việc sử dụng một loạt yếu tố sinh trưởng để thúc đẩy yếu tố sinh trưởng tế bào sừng, thúc đẩy hoạt tính của yếu tố sinh trưởng nội mô mạch máu, và thúc đẩy sự phát triển của lông tóc bằng cách ức chế hoạt tính của protein loại BMP. Tuy nhiên, mặc dù các yếu tố sinh trưởng này thể hiện tác dụng xuất sắc, cần có quá trình tái gấp cuộn bổ sung và cần thêm thời gian để thu được các yếu tố sinh trưởng tự nhiên, và cần có quy trình tinh chế phức tạp để loại bỏ nguồn ô nhiễm có nguồn gốc từ trực khuẩn ruột kết trong quá trình tinh chế. Ngoài ra, do độ ổn định và khối lượng phân tử cao của nó, không thể dễ dàng vượt qua lớp lông tóc bảo vệ, và do đó, điều này

cùng với chi phí đắt của nó làm giảm việc sử dụng nó.

Ngoài ra, có phương pháp mà ngăn ngừa sự làm mỏng lông tóc và làm cho lông tóc mỏng trở nên dày trở lại nhờ tính đối kháng của finasteride đối với 5 α -reductaza dựa trên tác động của finasteride với androgen. Để làm ví dụ đại diện, có Propecia (Merck U.S.A.) mà đã được phê chuẩn về tác dụng và độ ổn định của nó bởi Cục quản lý Dược phẩm và Thực phẩm (FDA) Hoa Kỳ vào tháng mười hai năm 1997 làm sản phẩm điều trị chứng rụng lông tóc đầu tiên có thể ăn được và được đưa ra thị trường dưới dạng sản phẩm điều trị chứng rụng lông tóc vào năm sau đó. Finasteride là dược chất mà ức chế enzym 5 α -reductaza là enzym chuyển hóa testosterone, một loại androgen, thành DHT gây ra chứng rụng lông tóc. Do sự sản sinh DHT được ức chế bằng cách dùng dược chất, nó đóng vai trò làm cho lông tóc hói mỏng trở nên dày và dài trở lại. Tuy nhiên, mất hàng tháng để finasteride gây ra tác dụng ngăn ngừa chứng rụng lông tóc. Ngoài ra, đối với phụ nữ, có khả năng cao xảy ra biến dạng bẩm sinh ở bào thai khi dùng dược chất này, và đối với nam giới, có sự sợ hãi về các tác dụng phụ như mất sinh lực, rối loạn cương, rối loạn xuất tinh, v.v., và áp lực mà tác dụng ngăn ngừa chứng rụng lông tóc chỉ có thể được duy trì khi dùng dược chất trong cả cuộc đời. Do đó, có nhiều hạn chế đối với việc sử dụng thực tế lâm sàng (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0120912).

Về vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát triển peptit Nokkin (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2010-0085407) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3, peptit Keramin2 (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2009- 0108323) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, và peptit WINT (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2011-0023991) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 là các peptit mà có độ ổn định cao hơn rất nhiều so với các yếu tố sinh trưởng tự nhiên và có thể cải thiện các vấn đề gây ra do khối lượng phân tử lớn của các yếu tố sinh trưởng tự nhiên đồng thời có chức năng hoặc tác dụng tương đương như hoặc tương tự như các yếu tố sinh trưởng tự nhiên. Tuy nhiên, finasteride được sử dụng thông thường hoặc các peptit có các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 đến 3 vẫn cần phải được cải thiện về các mặt cải thiện tác dụng ngăn ngừa chứng rụng lông tóc và thúc đẩy sự phát triển của lông tóc, làm giảm các tác dụng phụ và làm tăng độ hòa tan trong nước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề của chế phẩm tăng cường phát triển lông tóc thông thường. Mục đích của sáng chế là đề cập đến chế phẩm ngăn ngừa chứng rụng lông tóc và/hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc mà có chức năng tương tự hoặc cao hơn rất nhiều so với các chế phẩm phát triển lông tóc thông thường như các yếu tố sinh trưởng tự nhiên hoặc các peptit có các trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.3 hoặc finasteride, và có các đặc tính sinh lý học rất cao như khả năng thấm qua da và độ ổn định trong nước.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của finasteride và peptit bằng liên kết cộng hóa trị.

Theo một phương án, peptit có thể có từ 2 đến 30 axit amin, tốt hơn nếu 5 đến 20 axit amin, tốt hơn nữa nếu 8 đến 15 axit amin, và tốt hơn nữa nếu 10 đến 12 axit amin, nhưng không chỉ giới hạn ở các khoảng trị số này.

Theo một phương án, tốt hơn nếu, peptit này là peptit hòa tan trong nước, nhưng không chỉ giới hạn peptit này. Theo một phương án ưu tiên, peptit hòa tan trong nước có ít nhất 50%, tốt hơn nếu ít nhất 60%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 70%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 90%, và tốt nhất nếu 100% axit amin có mạch bên thân nước, và do đó, tốt hơn nếu cao. Theo một phương án, axit amin có mạch bên thân nước có thể là axit amin mang điện, ví dụ, arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp) hoặc axit glutamic (Glu), nhưng không chỉ giới hạn ở các axit amin này. Theo một phương án, peptit hòa tan trong nước có thể bao gồm ít nhất 3 axit amin mang điện, tốt hơn nếu ít nhất 5 axit amin mang điện, và tốt hơn nữa nếu ít nhất 7 axit amin mang điện, nhưng không chỉ giới hạn ở các trị số này.

Theo một phương án ưu tiên, peptit hòa tan trong nước có năm axit amin có mạch bên kỵ nước hoặc ít hơn, tốt hơn nếu bốn hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu ba hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu hai hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu một hoặc ít hơn, và tốt nhất nếu không có axit amin có mạch bên kỵ nước.

Theo một phương án, peptit có thể là peptit Nokkin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1, peptit Keramin2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, hoặc peptit WINT có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3, nhưng không chỉ giới hạn ở các

peptit này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến được phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc chứa thể tiếp hợp bất kỳ trong số các thể tiếp hợp nêu trên.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến mỹ phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc chứa thể tiếp hợp bất kỳ trong số các thể tiếp hợp nêu trên.

Theo một phương án, mỹ phẩm có thể có dạng bào chế như thuốc xức làm mềm, thuốc xức dạng sữa, kem dưỡng, kem xoa bóp, nước hoa, kem dùng cho mắt, kem làm sạch, bột làm sạch, nước làm sạch, miếng đắp, chế phẩm phun xịt, bột, thuốc bổ lông tóc, kem dùng cho lông tóc, thuốc xức dùng cho lông tóc, dầu gội dùng cho lông tóc, thuốc rửa lông tóc, dầu dưỡng lông tóc, thuốc xịt lông tóc, thuốc sol khí dùng cho lông tóc, sáp thơm, sol gel, nhũ tương, dầu, sáp và sol khí, nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng bào chế này.

Thể tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc liên hợp giữa finasteride và peptit bằng liên kết cộng hóa trị không chỉ có hoạt tính sinh lý rất cao như ngăn ngừa chứng rụng lông tóc, thúc đẩy sự phát triển của lông tóc, thúc đẩy sự phát triển của tế bào, v.v., mà còn có độ ổn định trong nước và khả năng thẩm da rất cao, và do đó, có thể được sử dụng hữu ích làm chế phẩm để ngăn ngừa chứng rụng lông tóc và thúc đẩy sự phát triển của lông tóc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện mức độ hòa tan của thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride trong nước.

Fig.2a và Fig.2b là các đồ thị thể hiện tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride đến hoạt tính 5 α reductaza. Fig.2a và Fig.2b lần lượt thể hiện nồng độ DHT và testosterone tương đối sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride.

Fig.3a là hình ảnh nhuộm miễn dịch thể hiện hình dạng và số lượng tế bào sừng sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride, và Fig.3b là đồ thị thể hiện số lượng tương đối của tế bào sừng theo nồng độ hợp chất dùng để xử lý.

Fig.4a là hình ảnh nhuộm miễn dịch thể hiện hình dạng và số lượng của các tế bào nhú bì lông tóc của người (human hair dermal papilla cell - HHDPC) sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride, và Fig.4b là đồ thị thể hiện số lượng tương đối của tế bào sừng theo nồng độ hợp chất dùng để xử lý.

Fig.5a là hình ảnh thẩm tách Western thể hiện mức độ vận chuyển beta-catenin vào trong nhân trong các tế bào HHDPC sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride, và Fig.5b là đồ thị chuyển đổi mức độ chuyển vị này thành các trị số tương đối so với đối chứng âm.

Fig.6a là hình ảnh thẩm tách Western thể hiện mức độ biểu hiện phospho-Smad1/5/8 trong các tế bào HHDPC sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride, và Fig.6b là đồ thị chuyển đổi mức độ biểu hiện này thành các trị số tương đối so với BMP2.

Fig.7a là hình ảnh điện di thể hiện mức độ biểu hiện ARN thông tin DKK-1 trong các tế bào HHDPC sau khi xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và finasteride, và Fig.7b là đồ thị chuyển đổi mức độ biểu hiện này thành các trị số tương đối so với đối chứng âm.

Fig.8a và Fig.8b là hình ảnh xác nhận tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự phát triển của lông tóc thông qua thử nghiệm trên động vật. Fig.8a so sánh mức độ phát triển của lông tóc chuột nhắt được dùng finasteride và thể tiếp hợp theo sáng chế, và Fig.8b xác nhận số lượng nang lông bằng cách nhuộm H&E lông tóc của da lưng của chuột nhắt được dùng finasteride và thể tiếp hợp theo sáng chế bằng H&E.

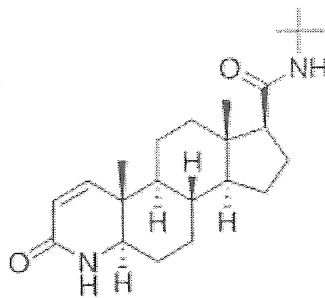
Fig.9a và Fig.9b là các đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm đánh giá khả năng thẩm qua da của thể tiếp hợp theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được mục đích, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của finasteride và peptit bằng liên kết cộng hóa trị.

Finasteride là N-(1,1-dimetyletyl)-3-oxo-(5 α ,17 β)-4-azaandrost-1-en-17-carboxamit có công thức 1.

Công thức 1



Theo sáng chế, thuật ngữ “peptit” có nghĩa là phân tử mạch thẳng được tạo ra thông qua liên kết peptit của các gốc axit amin. Peptit này có thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp sinh học hoặc hóa học nói chung đã biết trong lĩnh vực này, đặc biệt là bằng kỹ thuật tổng hợp pha rắn (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)).

Peptit có tác dụng làm tăng độ hòa tan trong nước của finasteride. Theo khía cạnh này, tốt hơn nếu, peptit là peptit hòa tan trong nước, nhưng không chỉ giới hạn ở peptit này. Theo một phương án, peptit có thể có từ 2 đến 30 axit amin, tốt hơn nếu 5 đến 20 axit amin, tốt hơn nữa nếu 8 đến 15 axit amin, và tốt hơn nữa nếu 10 đến 12 axit amin. Theo một phương án ưu tiên, peptit có ít nhất 50%, tốt hơn nếu ít nhất 60%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 70%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 80%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 90%, và tốt nhất nếu 100% axit amin có mạch bên thân nước, và do đó, tốt hơn nếu cao. Mặt khác, peptit có 50% hoặc ít hơn, tốt hơn nếu 40% hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu 30% hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu 20% hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu 10% hoặc ít hơn, và tốt nhất nếu 0% axit amin có mạch bên kỵ nước, và do đó, tốt hơn nếu thấp. Theo sáng chế, “axit amin có mạch bên thân nước” được dùng để chỉ arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), serin (Ser), threonin (Thr), asparagin (Asn), glutamin (Gln), cystein (Cys), selenocystein (Sec), glyxin (Gly) và prolin (Pro), và “axit amin có mạch bên kỵ nước” được dùng để chỉ alanin (Ala), valin (Val), isoleuxin (Ile), leuxin (Leu), metionin (Met), phenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr) và tryptophan (Trp), nhưng không chỉ giới hạn ở các axit amin này. Ngoài các axit amin có mặt trong thể giới tự nhiên, các biến thể của chúng có thể được sử dụng mà không có giới hạn. Theo một phương án, tốt hơn nếu axit amin có mạch bên thân nước là axit amin mang điện, như arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp) hoặc axit glutamic (Glu), nhưng không chỉ giới hạn ở các

axit amin này. Theo một phương án, peptit hòa tan trong nước có thể bao gồm ít nhất 3 axit amin mang điện, tốt hơn nếu ít nhất 5 axit amin mang điện, và tốt hơn nữa nếu ít nhất 7 axit amin mang điện, nhưng không chỉ giới hạn ở các trị số này.

Theo một phương án ưu tiên, peptit có năm hoặc ít hơn, tốt hơn nếu bốn hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu ba hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu hai hoặc ít hơn, tốt hơn nữa nếu một hoặc ít hơn, và tốt nhất nếu không có axit amin có mạch bên kỵ nước. Theo một phương án, peptit có thể là peptit Nokkin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1, peptit Keramin2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, hoặc peptit WINT có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit này.

Theo một phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế có chức năng thúc đẩy sự phát triển của tế bào sừng và các tế bào HHDPC. Theo một phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế có chức năng hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu WNT. Theo một phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế chuyển vị beta-catenin vào trong nhân.

Bản thân thể tiếp hợp theo sáng chế có độ ổn định rất cao, nhưng độ ổn định của nó có thể được cải thiện hơn nữa bằng cách cải biến axit amin bất kỳ cấu thành peptit được tiếp hợp với hợp chất này. Theo một phương án, đầu tận cùng N của peptit này có thể được tiếp hợp với nhóm bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm nhóm axetyl, nhóm florenyl metoxy cacbonyl, nhóm formyl, nhóm palmitoyl, nhóm myristyl, nhóm stearyl và polyetylen glycol (PEG), để cải thiện hơn nữa độ ổn định. Theo một phương án, peptit này có thể được tiếp hợp với nhóm bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm nhóm axetyl, nhóm florenyl metoxy cacbonyl, nhóm formyl, nhóm palmitoyl, nhóm myristyl, nhóm stearyl và polyetylen glycol (PEG), để cải thiện hơn nữa độ ổn định.

Việc cải biến axit amin như nêu trên cải thiện tốt độ ổn định của thể tiếp hợp theo sáng chế. Theo sáng chế, thuật ngữ “độ ổn định” được sử dụng để bao hàm không chỉ độ ổn định “*in vivo*”, mà còn độ ổn định “*in vitro*” như độ ổn định khi bảo quản (ví dụ, độ ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ trong phòng). Ngoài ra, nhóm bảo vệ được đề cập trên đây bảo vệ thể tiếp hợp theo sáng chế khỏi sự tấn công *in vivo* và *in vitro* của enzym phân giải protein.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị hoặc cải thiện chứng rụng lông tóc chứa thể tiếp hợp này làm hoạt chất. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế

phẩm để cải thiện tình trạng da chứa peptit này làm hoạt chất. Theo sáng chế, chế phẩm này có thể ở dạng dược phẩm hoặc thực phẩm lành mạnh, nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng bào chế này.

Do chế phẩm theo sáng chế chứa thể tiếp hợp theo sáng chế làm hoạt chất, phần mô tả chung giữa chúng được lược bỏ để tránh trùng lặp quá mức dẫn đến sự phức tạp của bản mô tả.

Theo một phương án, việc điều trị hoặc cải thiện chứng rụng lông tóc bằng thể tiếp hợp theo sáng chế là thúc đẩy sự phát triển của lông tóc hoặc làm mọc lông tóc. Theo một phương án ưu tiên, thể tiếp hợp theo sáng chế có khả năng thúc đẩy sự phát triển của tế bào sừng và các tế bào HHDPC, và thúc đẩy quá trình truyền tín hiệu beta-catenin, là quá trình truyền tín hiệu đại diện của protein WNT. Thông qua các thử nghiệm trên động vật được thực hiện dựa trên các kết quả này, có thể thấy rằng thể tiếp hợp theo sáng chế thúc đẩy sự phát triển của lông tóc một cách đáng kể. Do đó, chế phẩm theo sáng chế là rất có hiệu quả trong việc cải thiện sự phát triển của lông tóc và tình trạng da.

Ngoài ra, theo một phương án, việc cải thiện tình trạng da bằng thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm việc cải thiện nếp nhăn, cải thiện khả năng đàn hồi của da, ngăn ngừa lão hóa da, cải thiện việc làm ẩm da, loại bỏ sẹo hoặc tái sinh da.

Do chế phẩm theo sáng chế chứa thể tiếp hợp theo sáng chế làm hoạt chất, phần mô tả chung giữa chúng được lược bỏ để tránh trùng lặp quá mức dẫn đến sự phức tạp của bản mô tả.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế là dược phẩm chứa (a) thể tiếp hợp theo sáng chế với lượng có hiệu quả dược học; và (b) chất mang dược dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng có hiệu quả dược học” có nghĩa là lượng đủ để đạt được hiệu lực hoặc hoạt tính của thể tiếp hợp theo sáng chế.

Chất mang dược dụng của dược phẩm theo sáng chế mà nói chung được sử dụng để bào chế có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, gôm cây keo, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, xenluloza, nước, xirô, metyl xenluloza, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, talc, magie stearat và dầu khoáng, nhưng không chỉ giới hạn ở

các chất này. Ngoài các thành phần trên đây, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất làm trơn chảy, chất thấm ướt, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, chất nhũ hóa, chất gây thấm ổn định, chất bảo quản, v.v.. Các chất mang dược dụng thích hợp và các chế phẩm được mô tả chi tiết trong Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều đơn vị hoặc dạng nhiều liều bằng cách sử dụng chất mang và/hoặc tá dược được dụng theo phương pháp mà người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thực hiện được. Trong trường hợp này, dạng bào chế có thể là dạng dung dịch trong môi trường dầu hoặc nước, hỗn dịch hoặc nhũ tương, hoặc có thể ở dạng chiết xuất, bột, hạt, viên nén, viên nang hoặc gel (ví dụ, gel nước), và có thể còn chứa chất phân tán hoặc chất ổn định.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa trong quá trình dùng lâm sàng và có thể được sử dụng ở các dạng dược phẩm phổ biến. Tức là, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng ở các dạng bào chế qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa khác nhau trong quá trình dùng thực tế lâm sàng. Khi dược bào chế, có thể sử dụng chất pha loãng hoặc tá dược như chất làm đầy, chất làm đặc, chất kết dính, chất thấm ướt, chất gây vỡ, chất hoạt động bề mặt, v.v. thường được sử dụng. Các chế phẩm rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên tròn, bột, hạt, viên nang, v.v., và các chế phẩm rắn này được bào chế bằng cách trộn ít nhất một tá dược như tinh bột, canxi cacbonat, sucroza hoặc lactoza, gelatin, v.v. với chiết xuất thảo dược hoặc sản phẩm thảo dược được lên men. Ngoài ra, ngoài các tá dược đơn giản, chất làm trơn chảy như magie stearat hoặc talc có thể được sử dụng. Các chế phẩm lỏng để dùng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương, xirô, v.v., và có thể chứa các tá dược khác nhau như chất thấm ướt, chất tạo hương vị, chất thơm, chất bảo quản, v.v., ngoài nước và parafin lỏng, mà là các chất pha loãng đơn giản thường được sử dụng. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước, dung dịch không phải nước, hỗn dịch, nhũ tương, chế phẩm được sấy thăng hoa, và chế phẩm dạng đặt đã được tiệt trùng. Để làm các dung môi không phải nước hoặc hỗn dịch, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, este để tiêm như etyl oleat, v.v. có thể được sử dụng. Để làm cốt của chế phẩm dạng đặt, witepsol, Macrogol, Tween 61, bơ cacao, chất béo laurin, glyxerol, gelatin, v.v. có thể được sử dụng.

Dược phẩm dạng liều đơn vị có thể chứa, ví dụ, 1, 2, 3 hoặc 4 liều riêng hoặc 1/2, 1/3 hoặc 1/4 liều riêng. Liều riêng chứa lượng dược chất mà được dùng trong một lần dùng và liều này thường tương ứng với toàn bộ, 1/2, 1/3 hoặc 1/4 liều hằng ngày.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều đơn vị hoặc dạng nhiều liều bằng cách sử dụng chất mang và/hoặc tá dược được dùng theo phương pháp mà người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thực hiện được. Trong trường hợp này, dạng bào chế có thể là dạng dung dịch trong môi trường dầu hoặc nước, hỗn dịch hoặc nhũ tương, hoặc có thể ở dạng chiết xuất, bột, hạt, viên nén, viên nang hoặc gel (ví dụ, gel nước), và có thể còn chứa chất phân tán hoặc chất ổn định.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế là mỹ phẩm chứa (a) thể tiếp hợp theo sáng chế với lượng có hiệu quả về mặt thẩm mỹ; và (b) chất mang được chấp nhận dùng trong mỹ phẩm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng có hiệu quả về mặt thẩm mỹ” có nghĩa là lượng đủ để đạt được hiệu quả cải thiện da của chế phẩm theo sáng chế.

Mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng bào chế bất kỳ thường được bào chế trong lĩnh vực này. Ví dụ, nó có thể được bào chế thành dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, bột nhão, gel, kem, thuốc xức, bột, xà phòng, chế phẩm làm sạch chứa chất hoạt động bề mặt, dầu, nền dạng bột, nền dạng nhũ tương, nền dạng sáp và chế phẩm phun xịt, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này. Cụ thể hơn, nó có thể được bào chế thành các dạng khác nhau như thuốc xức dùng cho da, thuốc xức dạng sữa, kem dưỡng, kem xoa bóp, nước hoa, kem dùng cho mắt, kem làm sạch, bột làm sạch, nước làm sạch, miếng đắp, chế phẩm phun xịt, bột, thuốc bổ lông tóc, kem dùng cho lông tóc, thuốc xức dùng cho lông tóc, dầu gội dùng cho lông tóc, thuốc rửa lông tóc, dầu dưỡng lông tóc, thuốc xịt lông tóc, thuốc sol khí dùng cho lông tóc, sáp thơm, dung dịch như gel, v.v., sol gel, nhũ tương, dầu, sáp, sol khí, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là bột nhão, kem hoặc gel, thì dầu động vật, dầu thực vật, sáp, parafin, tinh bột, tragacan, dẫn xuất xenluloza, polyetylen glycol, silic, bentonit, silic dioxit, talc hoặc kẽm oxit, v.v. có thể được sử dụng làm thành phần chất mang.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là bột hoặc xít, thì lactoza, talc, silic dioxit, nhôm hydroxit, canxi silicat, hoặc bột polyamit có thể được sử dụng làm thành phần chất mang, và đặc biệt là, chế phẩm dạng xít có thể còn chứa chất đẩy như clo flo hydrocacbon, propan/butan hoặc dimetyl ete, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là dung dịch hoặc nhũ tương, thì dung môi, chất làm tăng độ hòa tan hoặc chất nhũ hóa có thể được sử dụng làm thành phần chất mang. Ví dụ, nước, etanol, isopropanol, etyl cacbonat, etyl axetat, rượu benzylic, benzyl benzoat, propylen glycol, dầu 1,3-butylglycol, glyxerol este béo, polyetylen glycol hoặc sorbitan este của axit béo có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là hỗn dịch, thì chất pha loãng dạng lỏng như nước, etanol hoặc propylen glycol, hỗn dịch như rượu isostearyl được etoxyl hóa, polyoxyetylen sorbitol este và polyoxyetylen sorbitan este, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, thạch hoặc tragacan, v.v. có thể được sử dụng làm thành phần chất mang, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là chế phẩm làm sạch chứa chất hoạt động bề mặt, thì rượu béo sulfat, rượu béo ete sulfat, monoeste của axit sulfosuccinic, isethionat, dẫn xuất imidazolini, metyl taurat, sarcosinat, amit ete sulfat của axit béo, alkyl amido betain, rượu béo, glyxerit của axit béo, dietanolamit của axit béo, dầu thực vật, dẫn xuất lanolin, hoặc glyxerol este của axit béo được etoxyl hóa, v.v. có thể được sử dụng làm thành phần chất mang, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Khi dạng bào chế theo sáng chế là dầu gội dùng cho lông tóc, thì các thành phần nền để tạo nên dầu gội như chất làm đặc, chất hoạt động bề mặt, chất kiểm soát độ nhớt, chất giữ ẩm, chất kiểm soát độ pH, chất bảo quản, tinh dầu, v.v. được trộn với thể tiếp hợp theo sáng chế. Để làm chất làm đặc, CDE có thể được sử dụng. Để làm chất hoạt động bề mặt, chất hoạt động bề mặt anion như LES và chất hoạt động bề mặt lưỡng tính như coco betain có thể được sử dụng. Để làm chất kiểm soát độ nhớt, polyquater có thể được sử dụng. Để làm chất giữ ẩm, glyxerin có thể được sử dụng. Để làm chất kiểm soát độ pH, axit xitric và natri hydroxit có thể được sử dụng. Để làm chất bảo quản, chiết xuất cây bưởi chùm có thể được sử dụng. Ngoài các thành phần này, tinh dầu như gỗ tuyết tùng, cây bạc hà, cây hương thảo, v.v., và axit amin tơ tằm, pentaol, vitamin E, v.v. có thể

được bổ sung vào. Theo một phương án, tương ứng với 100 phần khối lượng của thể tiếp hợp theo sáng chế, 5 đến 10 phần khối lượng CDE, 30 đến 40 phần khối lượng LES, 10 đến 20 phần khối lượng coco betain, 0,1 đến 0,2 phần khối lượng polyquater, 5 đến 10 phần khối lượng glyxerin, 0,1 đến 1,01 phần khối lượng chiết xuất cây bưởi chùm, 0,5 đến 1 phần khối lượng axit amin tơ tằm, 0,5 đến 1 phần khối lượng pintail, 0,5 đến 2 phần khối lượng vitamin E, và 0,01 đến 0,1 phần khối lượng của chất bất kỳ trong số tinh dầu của gỗ tuyết tùng, cây bạc hà, cây hương thảo, có thể được trộn với nhau, nhưng không chỉ giới hạn ở các lượng này.

Các thành phần được bao gồm trong mỹ phẩm theo sáng chế bao gồm các thành phần thường được sử dụng trong mỹ phẩm, ngoài hoạt chất là thể tiếp hợp theo sáng chế và các thành phần chất mang. Ví dụ, mỹ phẩm có thể còn chứa chất hỗ trợ thông thường như chất ổn định, chất làm tăng độ hòa tan, vitamin, chất màu và chất thơm, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không chỉ giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Tổng hợp thể tiếp hợp theo sáng chế

1-1 Tổng hợp peptit

1-1-1 Tổng hợp peptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3

700 mg nhựa clotrityl clorua (CTL resin; Nova biochem 0064 Cat No. 01-64-0021) được đưa vào trong thiết bị phản ứng và được khuấy trong 3 phút sau khi bổ sung 10 ml metylen clorua (MC). Sau khi loại bỏ dung dịch, 10 ml dimetylformamit (DMF) được bổ sung vào. Sau đó, sau khi khuấy trong 3 phút, dung môi được loại bỏ lần nữa. Sau khi bổ sung 10 ml diclometan (DCM) vào thiết bị phản ứng, 200 mmol Fmoc-Cys(trt)-OH (Bachem, Thụy Sĩ) và 400 mmol diisopropyletylamin (DIEA) được bổ sung vào và được hòa tan kỹ bằng cách khuấy. Sau khi phản ứng trong 1 giờ kết hợp khuấy, hỗn hợp này được rửa và được hòa tan bằng metanol và DIEA (2:1) trong DCM. Sau khi phản ứng trong 10 phút, hỗn hợp này được rửa bằng DCM/DMF (1:1) dư. Sau khi loại bỏ dung dịch, tiếp theo bổ sung 10 ml DMF và khuấy trong 3 phút, dung môi được loại bỏ

lần nữa. Sau khi bổ sung 10 ml dung dịch loại bảo vệ (piperidin/DMF 20%) vào thiết bị phản ứng, hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó, dung dịch được loại bỏ. Sau khi bổ sung lần nữa một lượng dung dịch loại bảo vệ giống như vậy và tiến hành phản ứng trong 10 phút, dung dịch được loại bỏ và nhựa Cys(trt)-CTL được điều chế bằng cách lần lượt rửa hai lần bằng DMF, một lần bằng MC, và một lần bằng DMF, trong 3 phút.

Sau khi bổ sung 10 ml DMF vào một thiết bị phản ứng khác, 200 mmol Fmoc-His(trt)-OH (Bachem, Thụy Sĩ) và 200 mmol Bop được bổ sung vào và được hòa tan kỹ bằng cách khuấy. Sau khi bổ sung 400 mmol DIEA vào thiết bị phản ứng theo hai phần, hỗn hợp này được khuấy trong ít nhất 5 phút cho đến khi tất cả chất rắn được hòa tan. Dung dịch hỗn hợp axit amin thu được được bổ sung vào thiết bị phản ứng chứa nhựa đã được loại bảo vệ và được cho phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp khuấy. Sau khi loại bỏ dung dịch phản ứng, tiếp theo khuấy với dung dịch DMF lần lượt 3 lần, 5 phút, dung dịch này được loại bỏ. Một lượng nhỏ nhựa đã được phản ứng được lấy ra và đưa vào thử nghiệm Kaiser (Nihydrine Test) để xác định mức độ phản ứng. Nhựa His(trt)-Cys(trt)-CTL được điều chế theo cách giống như đã được mô tả trên đây bằng cách loại bảo vệ 2 lần bằng dung dịch loại bảo vệ. Sau khi rửa đủ bằng DMF và MC và thực hiện thử nghiệm Kaiser một lần nữa, việc gắn axit amin được thực hiện như sau theo cách giống như đã được mô tả trên đây.

Theo trình tự axit amin được chọn, phản ứng chuỗi được thực hiện theo thứ tự Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Arg, Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Val, Fmoc-Arg, Fmoc-Thr, Fmoc-Gln(trt) và Fmoc-Arg(pbf). Sau khi cho nhóm bảo vệ Fmoc phản ứng với dung dịch loại bảo vệ lần lượt hai lần trong 10 phút, dung dịch được loại bỏ bằng cách rửa kỹ. Sau khi tiến hành axetyl hóa trong một giờ bằng cách bổ sung anhydrit axetic, DIEA và HoBt, nhựa peptidyl đã được bào chế được rửa 3 lần, mỗi lần bằng DMF, MC và metanol, được làm khô bằng cách phun từ từ khí nitơ, làm khô hoàn toàn với sự có mặt của P₂O₅ dưới áp suất thấp, được cho phản ứng với 30 ml dung dịch được phép (chứa axit trifloaxetic 95%, nước cất 2,5% và thioanisol 2,5%) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy gián đoạn. Nhựa này được lọc và rửa bằng một lượng nhỏ dung dịch TFA, sau đó, phần dịch lọc được kết hợp với nước cất. Sau khi chưng cất dưới áp suất thấp để làm giảm tổng thể tích xuống khoảng một nửa, tạo kết tủa bằng cách bổ sung 50 ml ete lạnh và kết tủa

được tạo ra được gom lại bằng cách ly tâm, tiếp theo rửa hai lần bằng ete lạnh. Sau khi loại bỏ nước cái, sản phẩm thu được được làm khô một cách đầy đủ dưới môi trường khí nitơ để thu được 0,65 g peptit NH₂-Arg-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH chưa được tinh chế (SEQ ID NO.3) (hiệu suất: 92,6%). Khối lượng phân tử đo được là 1287,1 (trị số lý thuyết: 1286,5) bằng cách sử dụng thiết bị phân tích khối lượng phân tử.

1-1-2 Tổng hợp peptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2

Peptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 (Glu- Leu-Ile-Glu-His-Gly-Gly-Gly-Arg-Pro-Ala-Asp: ELIEHGGGRPAD) và peptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 (Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His: Ac-YKSKKGGWTH) được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp giống như trong ví dụ 1-1-1.

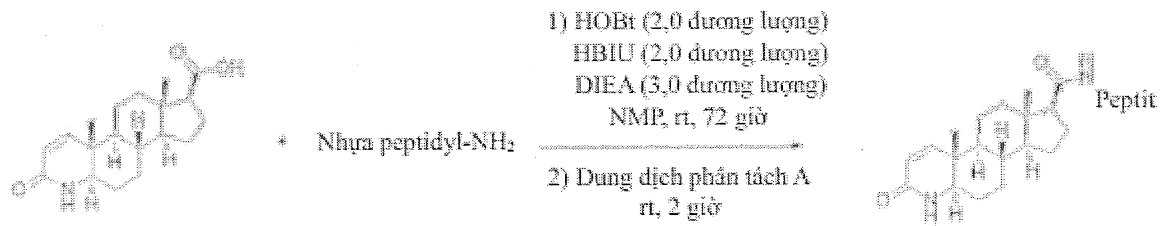
Bảng 1

SEQ ID NO.	Trình tự axit amin	Trị số đo được (thiết bị phân tích khối lượng phân tử)	
		Trị số đo được	Trị số lý thuyết
1	ELIEHGGGRPAD	1250,9	1250,35
2	Ac-YKSKKGGWTH	1233,8	1233,4
3	RQTRVERCHC	1287,1	1286,5

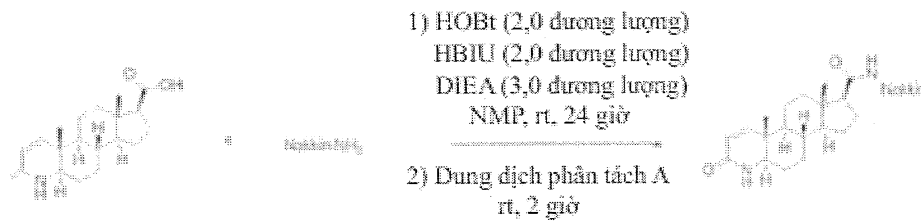
1-2 Tổng hợp thể tiếp hợp theo sáng chế

1 mmol nhựa peptidyl và 10 ml 1-metyl-2-pyrrolidon (NMP) được đưa vào thiết bị phản ứng peptit và được cho phản ứng trong 30 phút sau khi bổ sung 270 mg (2,0 đương lượng) 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) và 759 mg (2,0 đương lượng) N,N,N',N'-tetrametyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uroni hexaflophosphat, O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyl uroni hexaflophosphat. Sau khi bổ sung 388 mg (3 đương lượng) N,N-diisopropyletylamin (DIEA) và 624 mg (2,0 đương lượng) chất tương tự finasteride, hỗn hợp này được cho phản ứng trong 24 đến 72 giờ ở nhiệt độ trong phòng để thu được nhựa peptidyl đã được phản ứng bằng cách lọc. Sau khi phản ứng nhựa thu được trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng dung dịch phân tách, nhựa và nhóm bảo vệ được loại bỏ. Sau khi tái kết tinh bằng cách sử dụng 10 ml (10 mmol) dietyl ete, peptit ghép thu được. Sơ đồ phản ứng của thể tiếp hợp của finasteride và peptit bằng liên kết cộng hóa trị được mô tả chi tiết dưới đây.

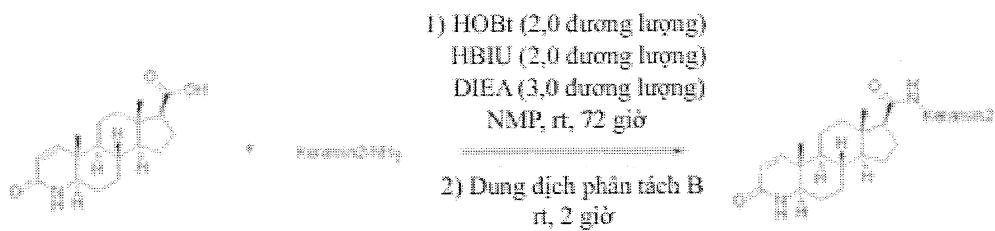
Sơ đồ phản ứng 1 Sơ đồ phản ứng của peptit ghép CG-peptit-finasteride



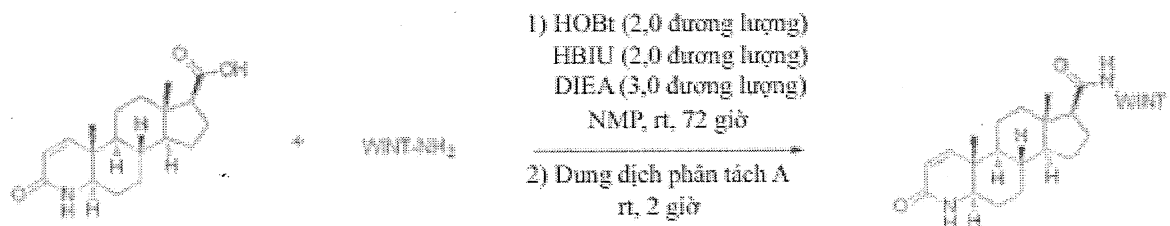
Sơ đồ phản ứng 2 Sơ đồ phản ứng của peptit ghép CG-Nokkin-finasteride



Sơ đồ phản ứng 3 Sơ đồ phản ứng của peptit ghép CG-Keramin2-finasteride



Sơ đồ phản ứng 4 Sơ đồ phản ứng của peptit ghép CG-WINT-finasteride



Ví dụ thử nghiệm 1. Thử nghiệm hòa tan của thể tiếp hợp theo sáng chế

Thể tiếp hợp finasteride-CG-Nokkin (thể tiếp hợp 1), thể tiếp hợp finasteride-CG-Keramin2 (thể tiếp hợp 2), thể tiếp hợp finasteride-CG-WINT (thể tiếp hợp 3) được bào chế trong ví dụ 1-2, và finasteride mỗi chất lần lượt được hòa tan trong nước cất với nồng

độ 10 mg/ml.

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng bản thân finasteride hầu như không được hòa tan trong nước, còn các thể tiếp hợp 1 đến 3 theo sáng chế đều được hòa tan hoàn toàn trong nước (Fig.1)

Ví dụ thử nghiệm 2. Phân tích về tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến hoạt tính 5 α reductaza

Để xác nhận tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến hoạt tính 5 α reductaza, trước tiên, chiết xuất tế bào gan đã được biết là có một lượng lớn 5 α reductaza được gom lại bằng phương pháp chiết protein. Sau khi cho testosterone phản ứng với finasteride hoặc các thể tiếp hợp 1 đến 3 theo sáng chế, chiết xuất tế bào gan được đưa vào dung dịch tương ứng và được cho phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Chất phản ứng của quá trình đưa chiết xuất tế bào gan vào trong testosterone và cho nó phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C là đối chứng. Sau khi phản ứng được hoàn thành, lượng testosterone và DHT được xác nhận bằng HPLC. Phân tích HPLC được thực hiện trong các điều kiện sau.

- cột C18
- UV 240 nm
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Pha động: A: 0,1% axit formic trong nước
B: 0,1% axit formic trong axetonitril
- Gradient: 0 phút B 5% ~ 30 phút B 80%

Kết quả là, khi so với đối chứng, nồng độ testosterone được tăng lên khi được xử lý bằng finasteride và các thể tiếp hợp theo sáng chế, và nồng độ DHT được giảm theo tỷ lệ đó. Ngoài ra, khi so với trường hợp được xử lý bằng finasteride, đã xác nhận được rằng mức độ tăng nồng độ testosterone và mức độ giảm nồng độ DHT là rõ rệt hơn khi được xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế (xem Fig.2a và Fig.2b).

Ví dụ thử nghiệm 3. Tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự phát triển của tế bào sùng

Để phân tích tác dụng tương tự và tác dụng ức chế của các yếu tố sinh trưởng so với thể tiếp hợp được tổng hợp trong ví dụ 1-2, thử nghiệm đo nhiệt lượng sulfohodomin B (SRB) được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào sừng HaCaT (Korean Cell Line Bank) theo phương pháp của Rizzino và các đồng tác giả (Rizzino, et al. Cancer Res. 48:4266(1988)).

Các tế bào sừng HaCaT được nuôi cấy dưới khí CO₂ 5% trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong môi trường của Eagle được cải biến bởi Dulbecco (DMEM, Gibco, U.S.A.) chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS; Sigma) sau khi gây nhiễm mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ bằng 3.000 tế bào. Dòng tế bào đã được nuôi cấy được xử lý bằng dung dịch trypsin 1% để tách dòng tế bào đã được nuôi cấy ra khỏi đáy của bình nuôi cấy và được ly tâm để thu các hạt tế bào. Chúng được gây thẩm ổn định lại trong môi trường nuôi cấy DMEM không chứa FBS và được nuôi cấy dưới khí CO₂ 5% trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau 24 giờ sau đó, môi trường được thay đổi bằng môi trường nuôi cấy giống như vậy không chứa huyết thanh, và các tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ dưới các điều kiện giống như đã được mô tả trên đây với mẫu trắng được hòa tan trong 10% DMSO trong điều kiện đã được tiết trùng làm đối chiếu, các thể tiếp hợp 1 đến 3 theo sáng chế (50µM), finasteride (50µM), và EGF (100 nM) được sử dụng làm đối chiếu dương tính. Sau khi loại bỏ dịch nổi và cố định các tế bào bằng cách sử dụng etanol, các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffer saline - PBS). Sau khi loại bỏ dung dịch rửa, và xử lý bằng dung dịch SRB đo nhiệt lượng, tiếp theo rửa đầy đủ bằng dung dịch axit axetic 1%, các tế bào được quan sát dưới kính hiển vi để đánh giá khả năng sống của tế bào. Ngoài ra, độ hấp thụ được đo ở các tia cực tím 560 nm để phân tích sự tăng sinh tế bào.

Sau khi xử lý tế bào sừng bằng thể tiếp hợp theo sáng chế và quan sát sự thay đổi hình thái học trong các tế bào 72 giờ sau đó, đã xác nhận được rằng thể tiếp hợp theo sáng chế làm thay đổi sự phát triển và hình dạng hình thái của tế bào sừng (Fig.3a). Ngoài ra, đã xác nhận được rằng mức độ phát triển của tế bào sừng được tăng mạnh khi được xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế so với trường hợp được xử lý bằng finasteride (Fig.3b).

Ví dụ thử nghiệm 4. Tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự phát triển của

tế bào HHDPC

Tác dụng của các thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự phát triển của các tế bào HHDPC (ATCC/U.S.A.) được xác nhận theo cách giống như trong ví dụ thử nghiệm 3. Trong trường hợp này, MNX (10 uM) và IGF-1 (1uM) được sử dụng làm đối chứng dương.

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng thể tiếp hợp theo sáng chế làm thay đổi sự phát triển và hình dạng hình thái của tế bào HHDPC (Fig.4a). Ngoài ra, đã xác nhận được rằng mức độ phát triển của tế bào HHDPC được tăng mạnh khi được xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế so với trường hợp được xử lý bằng finasteride (Fig.4b).

Ví dụ thử nghiệm 5. Phân tích về tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến quá trình vận chuyển của beta-catenin vào trong nhân

Sau 5 giờ xử lý các tế bào HHDPC đã được nuôi cấy trong 48 giờ bằng các thể tiếp hợp theo sáng chế tổng hợp được trong ví dụ 1-2, tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến quá trình vận chuyển của beta-catenin, mà là chất truyền tín hiệu thiết yếu để thúc đẩy sự phát triển của lông tóc, vào trong nhân bằng quá trình truyền tín hiệu đại diện của protein WNT được đo. Sự biểu hiện của beta-catenin được quan sát thông qua thử nghiệm thấm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đối với beta-catenin (SantaCruz, U.S.A.), và xác nhận xem beta-catenin có chuyển vị vào trong nhân hay không bằng thử nghiệm hóa mô miễn dịch có sử dụng cùng kháng thể. Cụ thể, các tế bào HHDPC được nuôi cấy trong tủ ủ CO₂ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C sau khi gây nhiễm mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ bằng 100.000 tế bào. Môi trường này được thay đổi thành môi trường DMEM không chứa huyết thanh, và sau đó, sau khi xử lý các tế bào lần lượt bằng finasteride, thể tiếp hợp finasteride-WINT, WINT có các nồng độ 5 và 50µM, các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau khi chiết protein nhân và tế bào chất bằng cách sử dụng kit chiết protein, thử nghiệm thấm tách Western được thực hiện trong các điều kiện sau.

- chuẩn bị SDS-PAGE 12%
- nạp 15µg protein vào SDS-PAGE
- chuyển sang màng PVDF
- phong bế bằng dung dịch sữa gầy đã được làm khô 5% trong 1 giờ ở nhiệt độ

trong phòng

- cho phản ứng với kháng thể thứ nhất (kháng thể kháng beta-catenin, kháng HDAC, kháng thể kháng alpha tubulin) ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ với nồng độ 1/3000

- rửa ba lần bằng PBST trong 10 phút

- cho phản ứng với kháng thể thứ hai ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ với nồng độ 1/5000

- rửa ba lần bằng PBST trong 15 phút

- phát hiện

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng khi được xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế, mức độ biểu hiện của beta-catenin tăng. Ngoài ra, đã xác nhận được rằng beta-catenin được chuyển vị từ tế bào chất vào nhân bởi thể tiếp hợp theo sáng chế ngay cả khi đo xem beta-catenin có chuyển vị vào trong nhân hay không bằng hóa mô miễn dịch trong các tế bào HHDPC, và xác nhận được rằng thể tiếp hợp theo sáng chế vẫn tồn tại trong tế bào chất và có hoạt tính (Fig.5a và Fig.5b).

Ví dụ thử nghiệm 6. Phân tích tác dụng ức chế chuyển vị tín hiệu BMP của thể tiếp hợp theo sáng chế

Sau 5 giờ xử lý các tế bào HHDPC đã được nuôi cấy trong 48 giờ bằng các thể tiếp hợp theo sáng chế tổng hợp được trong ví dụ 1-2, tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến hoạt tính của phospho-Smad1/5/8, mà là chất truyền tín hiệu thiết yếu để ức chế chứng rụng lông tóc, bằng quá trình truyền tín hiệu đại diện của protein BMP được đo. Sự biểu hiện của phospho-Smad1/5/8 được xác nhận bằng thử nghiệm thâm tách Western có sử dụng kháng thể đối với phospho-Smad1/5/8. Cụ thể, các tế bào HHDPC được nuôi cấy trong tủ ủ CO₂ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C sau khi gây nhiễm mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ bằng 100.000 tế bào. Môi trường này được thay đổi thành môi trường DMEM không chứa huyết thanh, và sau đó, sau khi xử lý tế bào lần lượt bằng finasteride và thể tiếp hợp finasteride-Nokkin có các nồng độ 0,5, 5 và 50μM, các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau khi chiết protein nhân và tế bào chất bằng cách sử dụng kit chiết protein, thử nghiệm thâm tách Western được thực hiện trong các điều kiện sau.

- chuẩn bị SDS-PAGE 12%
- nạp 15µg protein vào SDS-PAGE
- chuyển sang màng PVDF
- phong bế bằng dung dịch sữa gầy đã được làm khô 5% trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng
- cho phản ứng với kháng thể thứ nhất (kháng thể kháng phospho-Smad1/5/8, kháng HDAC, kháng thể kháng alpha tubulin) ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ với nồng độ 1/3000
- rửa ba lần bằng PBST trong 10 phút
- cho phản ứng với kháng thể thứ hai ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ với nồng độ 1/5000
- rửa ba lần bằng PBST trong 15 phút
- phát hiện

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng khi được xử lý bằng thể tiếp hợp theo sáng chế, mức độ biểu hiện của phospho-Smad1/5/8 trong nhân giảm (Fig.6a và Fig.6b).

Ví dụ thử nghiệm 7. Phân tích về tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự biểu hiện của DKK-1

Tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự biểu hiện ARN thông tin của DKK-1, mà là protein chứng rụng lông tóc đại diện được biểu hiện bởi DHT được xác nhận. Cụ thể, các tế bào HHDPC được nuôi cấy trong tủ ủ CO₂ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C sau khi gây nhiễm mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ bằng 100.000 tế bào. Sau khi cho testosterone phản ứng với finasteride hoặc thể tiếp hợp finasteride-Nokkin là các thể tiếp hợp 1 đến 3 theo sáng chế, thể tiếp hợp finasteride-Keramin2 và thể tiếp hợp finasteride-WINT, chiết xuất tế bào gan được đưa vào dung dịch tương ứng và được cho phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Chất phản ứng của quá trình đưa chiết xuất tế bào gan vào trong testosterone và cho nó phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C được sử dụng làm đối chứng dương. Môi trường này được thay đổi thành môi trường DMEM không chứa huyết thanh, và sau đó, sau khi xử lý các tế bào lần lượt bằng finasteride và thể tiếp hợp finasteride-

Nokkin, thể tiếp hợp finasteride-Keramamine2 và thể tiếp hợp finasteride-WINT có nồng độ 50 μ M, các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau khi chiết ARN của tế bào bằng cách sử dụng kit chiết ARN, RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau.

1. DKK-1

- Đoạn mồi xuôi: (5') TGATGAGTACTGCGCTAGTC (3') (SEQ ID NO.4)

- Đoạn mồi ngược: (5') CTCCTATGCTTGGTACACAC (3') (SEQ ID NO.5)

2. GAPDH

- Đoạn mồi xuôi: (5') GGAGCCAAAAGGGTCATCAT (3') (SEQ ID NO.6)

- Đoạn mồi ngược: (5') GTGATGGCATGGACTGTGGT (3') (SEQ ID NO.7)

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng thể tiếp hợp theo sáng chế còn ức chế sự biểu hiện của DKK-1 tăng trong đối chứng dương nhiều hơn so với trường hợp được xử lý bằng finasteride, và đặc biệt là, nó có thể ức chế sự biểu hiện của DKK-1 xuống mức thậm chí thấp hơn đối chứng âm, mà không được xử lý bằng chất nào (Fig.7a và Fig.7b).

Ví dụ thử nghiệm 8. Thử nghiệm đánh giá sự phát triển của lông tóc

Tác dụng của thể tiếp hợp theo sáng chế đến sự phát triển của lông tóc được xác nhận thông qua thử nghiệm trên động vật. Cụ thể, lông trên lưng của chuột nhắt C57BL/6 được 7 tuần tuổi được loại bỏ bằng cách sử dụng kem làm rụng lông. Sau khi chuẩn bị PBS, finasteride và thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế ở các nồng độ 100 μ g/ml, chúng được đưa một cách đồng đều lên trên da lưng của chuột nhắt một ngày một lần, và màu của da lưng của chuột nhắt được quan sát bằng cách chụp ảnh từ thời điểm màu bắt đầu chuyển sang đen.

Sau đó, chuột nhắt được làm chết, và lông trên da lưng được quan sát thông qua việc nhuộm H&E. Nhằm mục đích này, sau khi thu da lưng của chuột nhắt và cố định nó trong paraformaldehyt (PFA) 4%, việc gắn bằng parafin được thực hiện. Sau khi cắt da lưng của chuột nhắt đã được gắn cố định với độ dày 4 μ m, số lượng nang lông được xác nhận thông qua việc nhuộm H&E.

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng chuột nhắt được dùng thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế biểu hiện rõ ràng tốc độ phát triển của lông chuột nhắt nhanh hơn so

với chuột nhắt được dùng PBS hoặc finasteride (Fig.8a), và xác nhận được rằng số lượng nang lông tăng lên đáng kể so với đối chứng và nhóm được dùng finasteride (Fig.8b).

Ví dụ thử nghiệm 9. Thử nghiệm đánh giá khả năng thấm qua da

Do finasteride là được chất kiểm soát các hormon loại steroid, nên khi nó được dùng qua đường miệng, có thể có các tác dụng phụ như gây độc toàn thân bằng cách phân tán thông qua máu. Do đó, nếu nó xuyên qua da ngay cả khi được dùng trên da, có khả năng là nó thấm vào trong toàn bộ cơ thể và gây độc, và nếu nó không thấm qua da, do nó còn lại trong da đầu và không phân tán vào trong toàn bộ cơ thể, các tác dụng phụ của finasteride có thể được ức chế. Về vấn đề này, sau khi dùng finasteride và thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế lên trên da nhân tạo ba chiều, các tác giả sáng chế xác nhận xem nó có thấm vào trong da hay không.

Nhằm mục đích này, finasteride và thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế lần lượt được trộn trong hỗn hợp dung môi gồm etanol 10%, propylen glycol 40% và nước tinh khiết 50%. Thử nghiệm tế bào khuếch đại Franz được thực hiện bằng cách sử dụng da nhân tạo ba chiều. Dung dịch finasteride và thể tiếp hợp finasteride-WINT lần lượt được dùng lên trên da nhân tạo ba chiều với lượng 1 ml, và để trong 24 giờ. Sau khi lấy mẫu dung dịch buồng thụ thể, finasteride và thể tiếp hợp finasteride-WINT thấm qua da được phát hiện bằng cách sử dụng HPLC. Điều kiện phát hiện finasteride của HPLC là cột C18, UV 210 nm, tốc độ dòng 1,6 ml/phút, axetonitril:nước = 45:55, và R.T. phát hiện là 9 đến 10 phút. Để phát hiện thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế, thử nghiệm giám sát nhiều phản ứng (multiple reaction monitoring - MRM), là phương pháp phát hiện khối lượng phân tử tương ứng được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị LC-MS/MS (3200 Qtrap). Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng thuốc chỉ được xử lý bằng finasteride có thấm qua da và do đó, được phát hiện, và thuốc được xử lý bằng thể tiếp hợp finasteride-WINT theo sáng chế không được phát hiện bằng chất thấm qua da và còn lại trong da (Fig.9a và Fig.9b). Các kết quả thử nghiệm của các ví dụ thử nghiệm 1 đến 9, có thể thấy rằng thể tiếp hợp theo sáng chế có các chức năng thúc đẩy sự phát triển của lông tóc và ức chế chứng rụng lông tóc rất rất cao và có chức năng chống lão hóa.

Ví dụ bào chế 1: Thuốc xức làm mềm

Thuốc xức làm mềm chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2

có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế thuốc xức.

Bảng 2

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	2,5
1,3-butylen glycol	6
Glyxerin	4
PEG 1500	1
Nnatri hyaluronat	1
Polysorbat 20	0,5
Etanol	8
Chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Benzopenon-9	0,05
Chất thơm	lượng rất nhỏ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

Ví dụ bào chế 2. Kem dưỡng

Kem dưỡng chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2 có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế kem dưỡng.

Bảng 3

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	2,5
Dầu meadowfoam	3
Rượu xetearylic	1,5
Axit stearic	1,5
Glyxeryl stearat	1,5
Parafin lỏng	10
Sáp ong	2
Polysorbat 60	0,6
Sorbitan sesquioleat	2,5
Squalan	3
1,3-butylen glycol	3
Glyxerin	5
Trietanolamin	0,5
Tocopheryl axetat	0,5
Chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Chất thơm	lượng vừa đủ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

Ví dụ bào chế 3. Thuốc xức dạng sữa

Thuốc xức dạng sữa chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2

có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế thuốc xức.

Bảng 4

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	2,5
1,3-butylen glycol	4
Glyxerin	4
Rượu xetearylic	0,8
Glyxeryl stearat	1
Trietanolamin	0,13
Tocopheryl axetat	0,3
Parafin lỏng	5
Squalan	3
Dầu hạt mắc ca	2
Polysorbat 60	1,5
Sorbitan sesquioleat	0,5
Carboxyvinylpolyme	1
Chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Chất thơm	lượng vừa đủ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

Ví dụ bào chế 4. Nước hoa

Nước hoa chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2 có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế nước hoa.

Bảng 5

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	2,5
Glyxerin	10
1,3-butylen glycol	5
PEG 1500	2
Allantoin	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hydroxyetyl xenluloza	0,1
Natri hyaluronat	8
Carboxyvinylpolyme	0,2
Trietanolamin	0,18
Octyldodeceth-16	0,4
etanol	6
chất thơm, chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

Ví dụ bào chế 5. Huyết thanh dưỡng tóc

Huyết thanh dưỡng tóc chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2 có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế huyết thanh dưỡng tóc.

Bảng 6

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	1
Glyxerin	10
1,3-butylen glycol	5
PEG 1500	2
Allantoin	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Hydroxyetyl xenluloza	0,1
Natri hyaluronat	8
Carboxyvinylpolyme	0,2
Trietanolamin	0,18
Octyldodeceth-16	0,4
Etanol	6
Chất thơm, chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

Ví dụ bào chế 6. Nước dưỡng tóc

Nước dưỡng tóc chứa thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế trong ví dụ 1-2 có thành phần như sau được bào chế theo phương pháp thông thường thường để bào chế nước dưỡng tóc.

Bảng 7

Thành phần	Hàm lượng (% khối lượng)
Thể tiếp hợp theo sáng chế	1
Glyxerin	2
1,3-butylen glycol	2
PEG 1500	2
Allantoin	0,1
DL-pantenol	0,3
EDTA-2Na	0,02
Natri hyaluronat	8
Carboxyvinylpolyme	0,2
Trietanolamin	0,18
Etanol	10
Chất thơm, chất bảo quản, chất màu	lượng vừa đủ
Nước tinh khiết	còn lại
Tổng số	100

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ tiếp hợp của finasteride và peptit, trong đó nhóm carboxylic ngoại vòng của axit finasteride được tiếp hợp trực tiếp với nhóm α -amin đầu tận cùng N của peptit thông qua liên kết amit, và peptit này có từ 8 đến 15 axit amin, và peptit này là peptit hòa tan trong nước, và peptit hòa tan trong nước này có ít nhất 70% axit amin có mạch bên thân nước, và axit amin có mạch bên thân nước được chọn từ nhóm bao gồm arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), serin (Ser), threonin (Thr), asparagin (Asn), glutamin (Gln), xystein (Cys), selenoxystein (Sec), glyxin (Gly) và prolin (Pro).
2. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó axit amin có mạch bên thân nước là axit amin mang điện được chọn từ nhóm bao gồm arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp) và axit glutamic (Glu).
3. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó peptit hòa tan trong nước có ít nhất ba axit amin mang điện được chọn từ nhóm bao gồm arginin (Arg), histidin (His), lysin (Lys), axit aspartic (Asp) và axit glutamic (Glu).
4. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó peptit hòa tan trong nước có năm axit amin hoặc ít hơn có mạch bên kỵ nước.
5. Thẻ tiếp hợp theo điểm 4, trong đó peptit hòa tan trong nước có ba axit amin hoặc ít hơn có mạch bên kỵ nước.
6. Thẻ tiếp hợp theo điểm 4, trong đó axit amin có mạch bên kỵ nước được chọn từ nhóm bao gồm alanin (Ala), valin (Val), isoleuxin (Ile), leuxin (Leu), metionin (Met), phenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr) và tryptophan (Trp).
7. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1, trong đó peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit Nokkin có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1, peptit Keramin2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.2, và peptit WINT có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3.
8. Dược phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc chứa thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
9. Mỹ phẩm phòng ngừa chứng rụng lông tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của lông tóc chứa thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

10. Mỹ phẩm theo điểm 9, trong đó mỹ phẩm này có dạng bào chế được chọn từ nhóm bao gồm thuốc xức dùng cho da, thuốc xức dạng sữa, kem dưỡng, kem xoa bóp, nước hoa, kem dùng cho mắt, kem làm sạch, bột làm sạch, nước làm sạch, miếng đắp, chế phẩm phun xịt, bột, thuốc bổ lông tóc, kem dùng cho lông tóc, thuốc xức dùng cho lông tóc, dầu gội dùng cho lông tóc, thuốc rửa lông tóc, dầu dưỡng lông tóc, thuốc xịt lông tóc, thuốc sol khí dùng cho lông tóc, sáp thơm, sol gel, nhũ tương, dầu, sáp và sol khí.

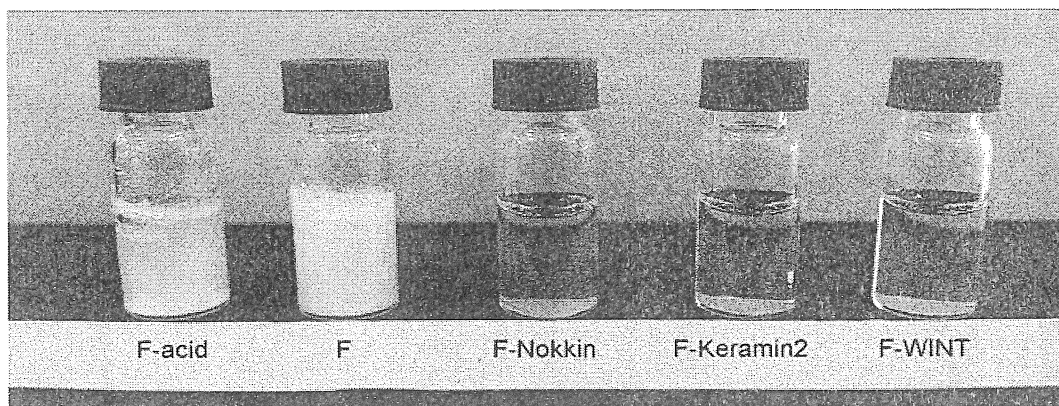


Fig.1

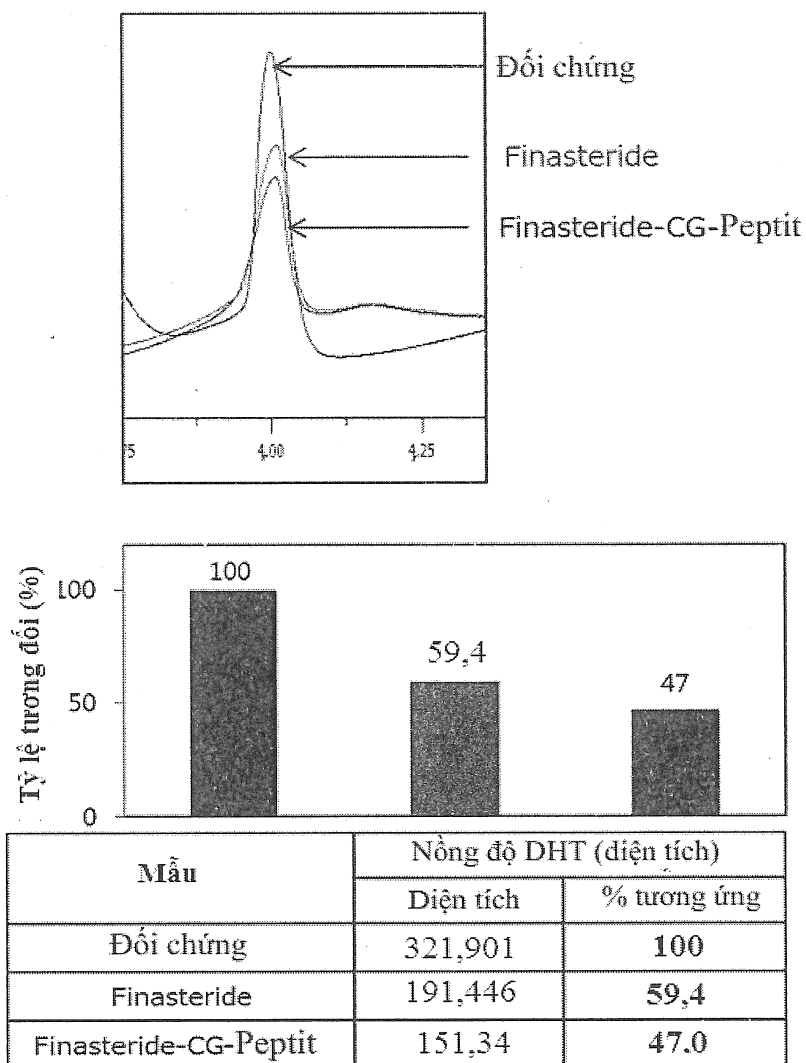
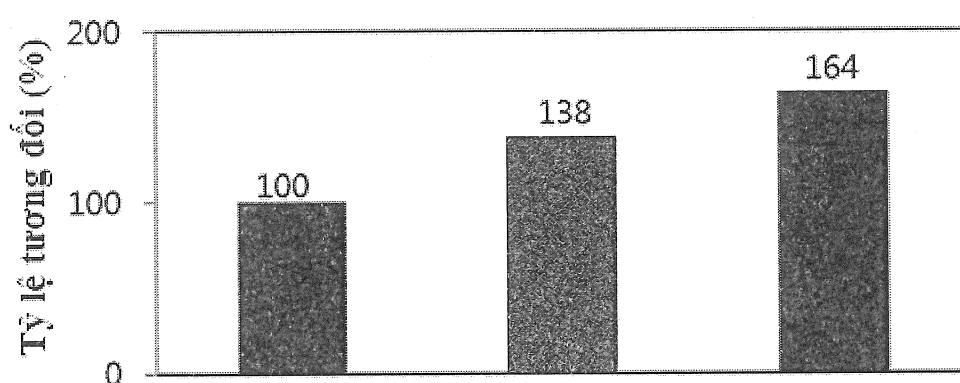
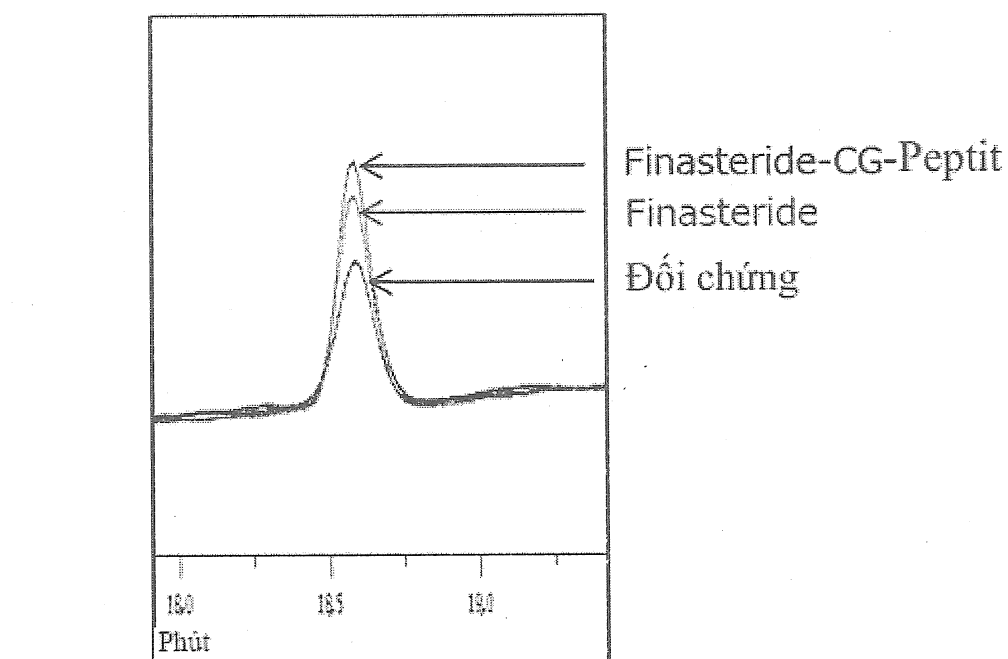
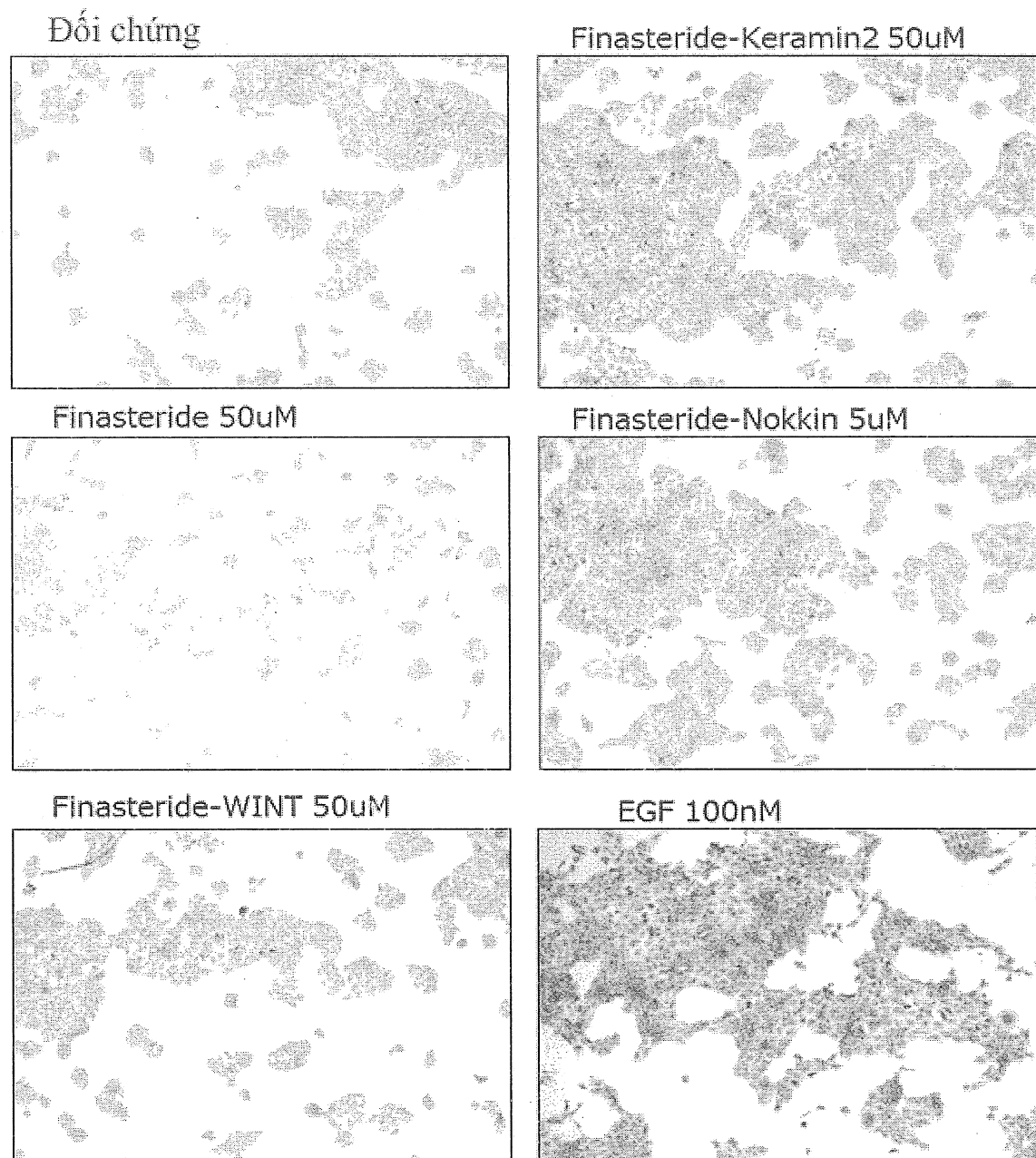


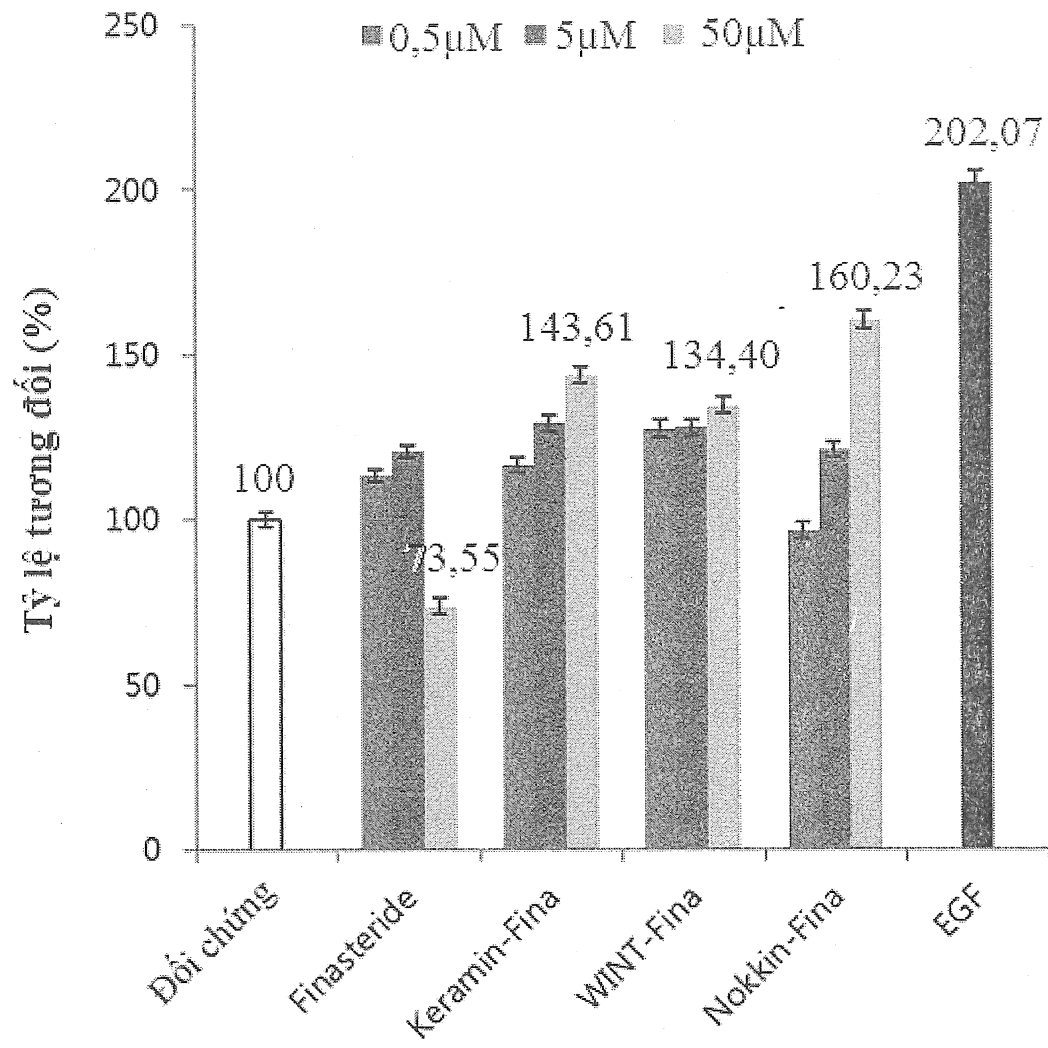
Fig.2a

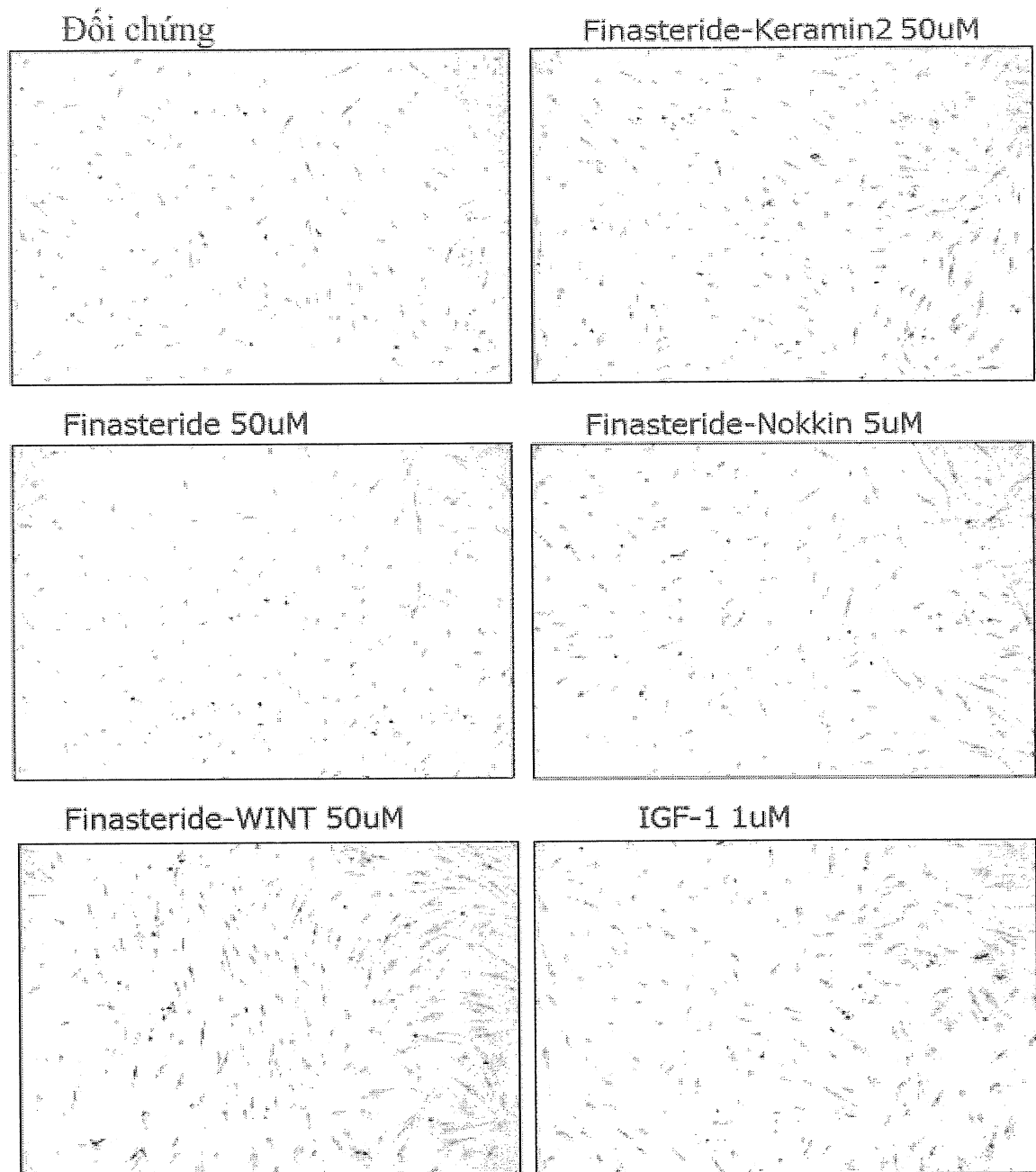


Mẫu	Nồng độ testosterone (diện tích)	
	Diện tích	% tương ứng
Đối chứng	97,201	100
Finasteride	134,179	138,0
Finasteride-CG-Peptit	159,426	164,0

Fig.2b

**Fig.3a**

**Fig.3b**

**Fig.4a**

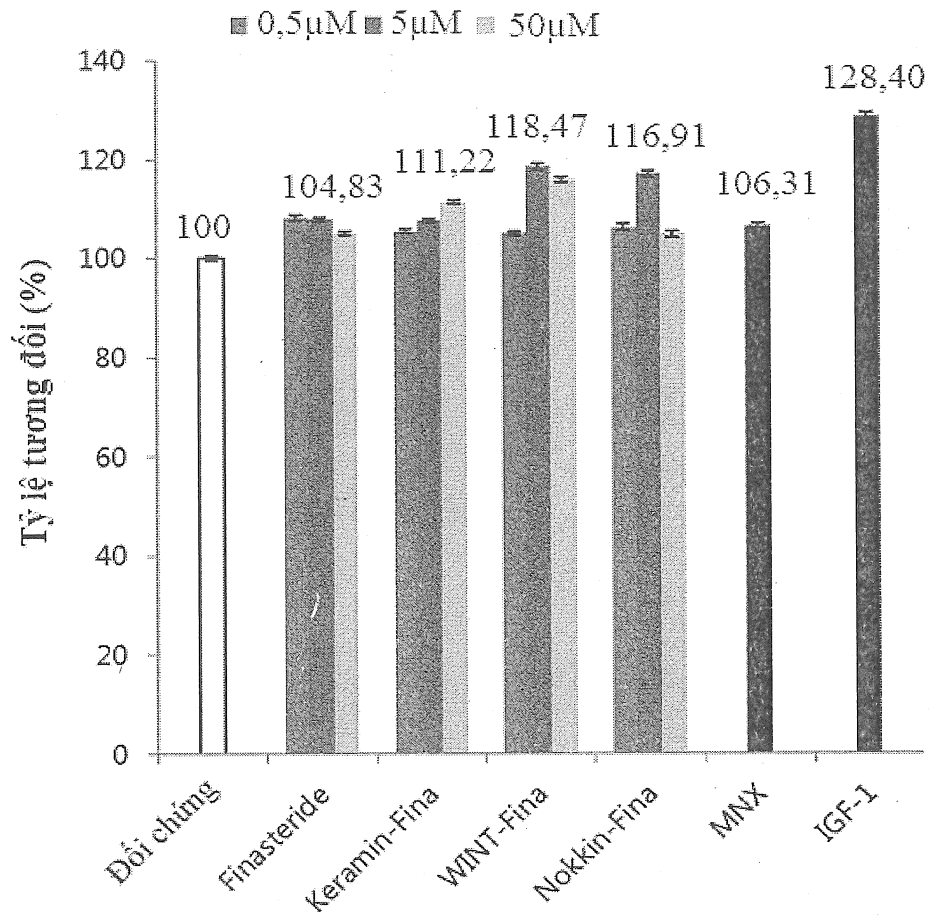


Fig.4b

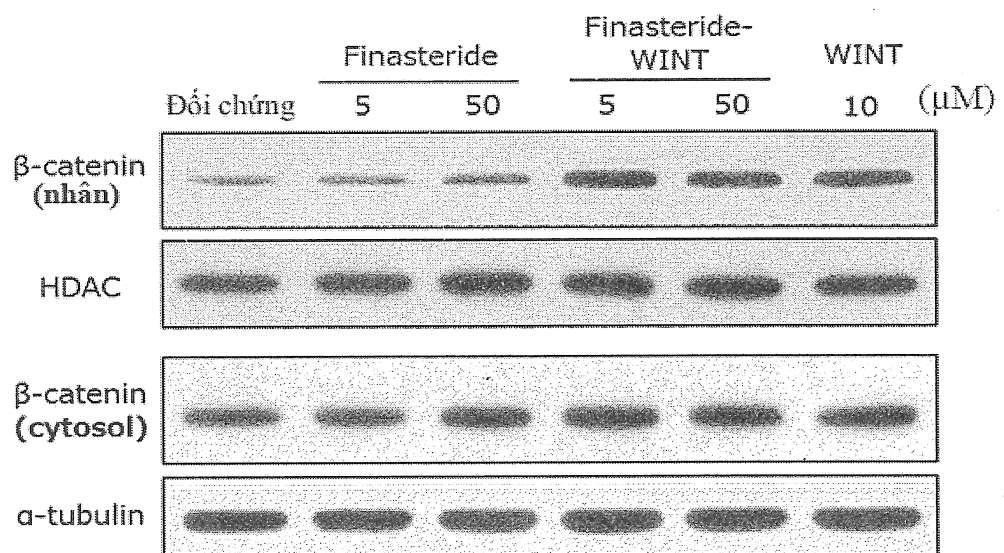


Fig.5a

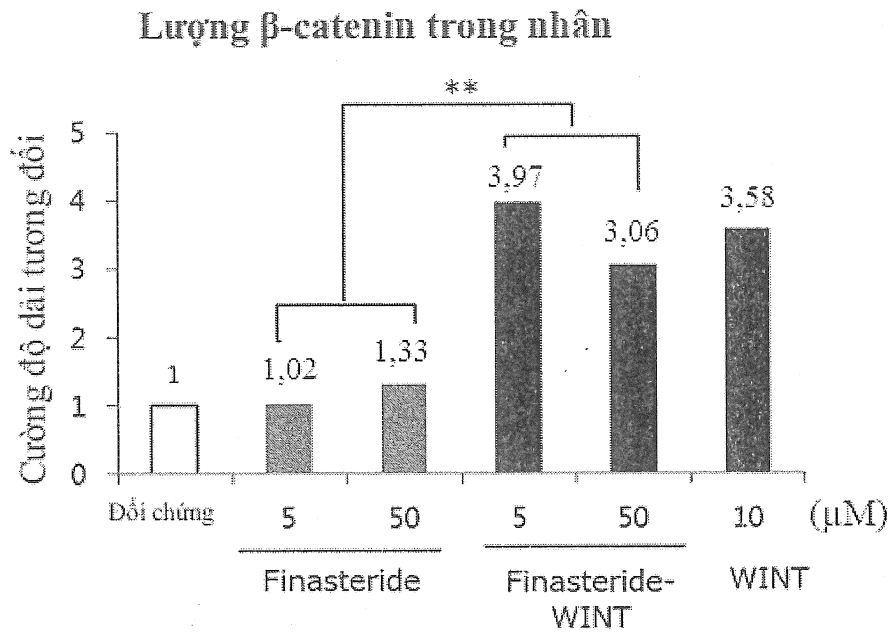


Fig.5b

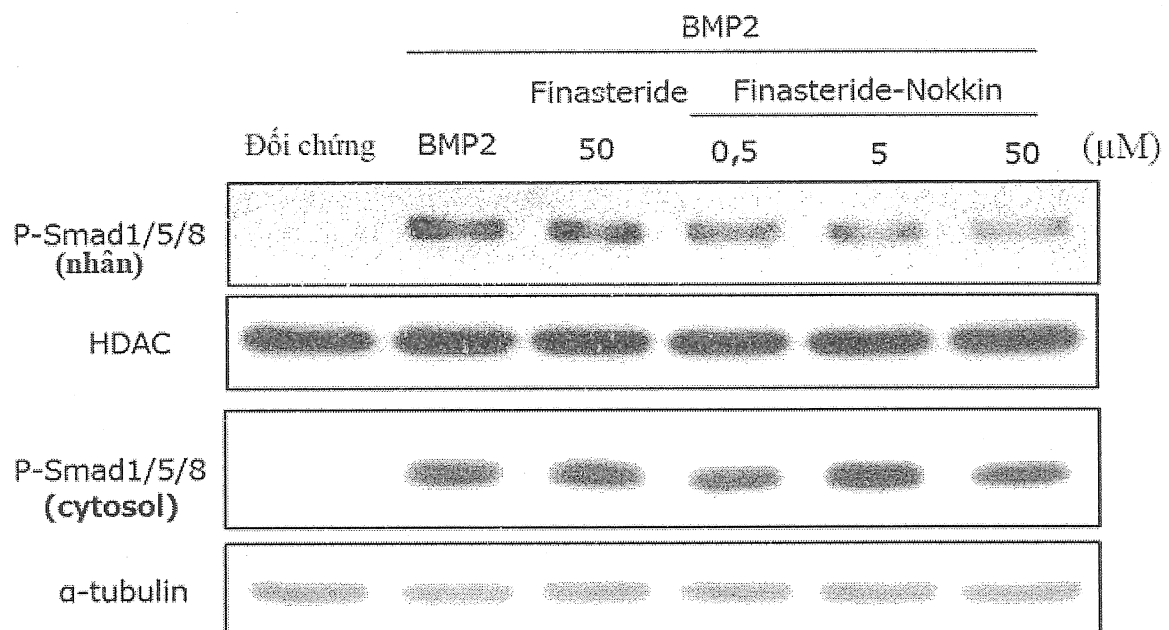


Fig.6a

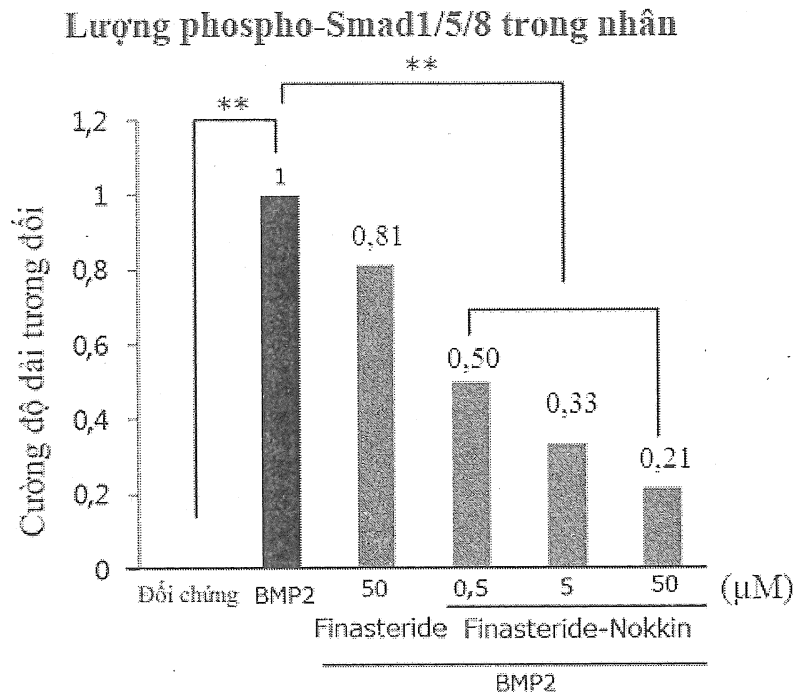


Fig.6b

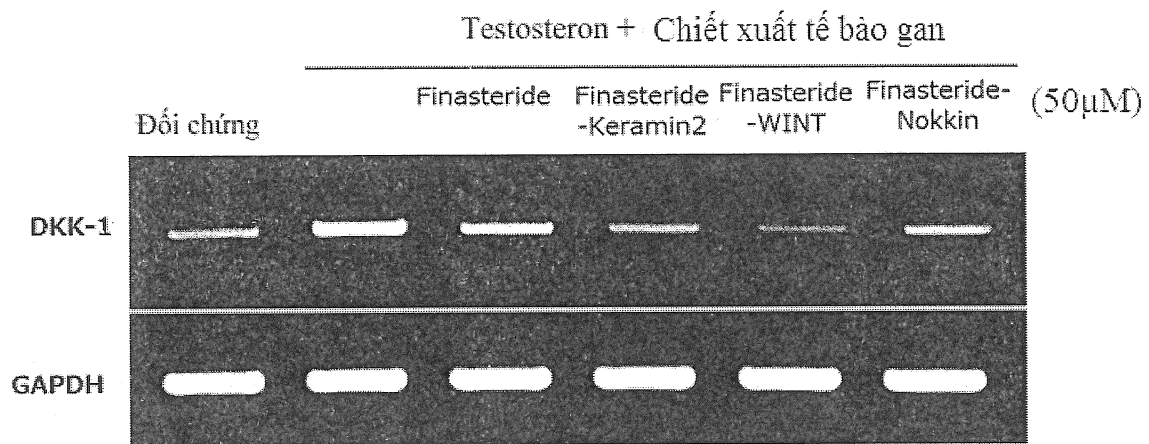


Fig.7a

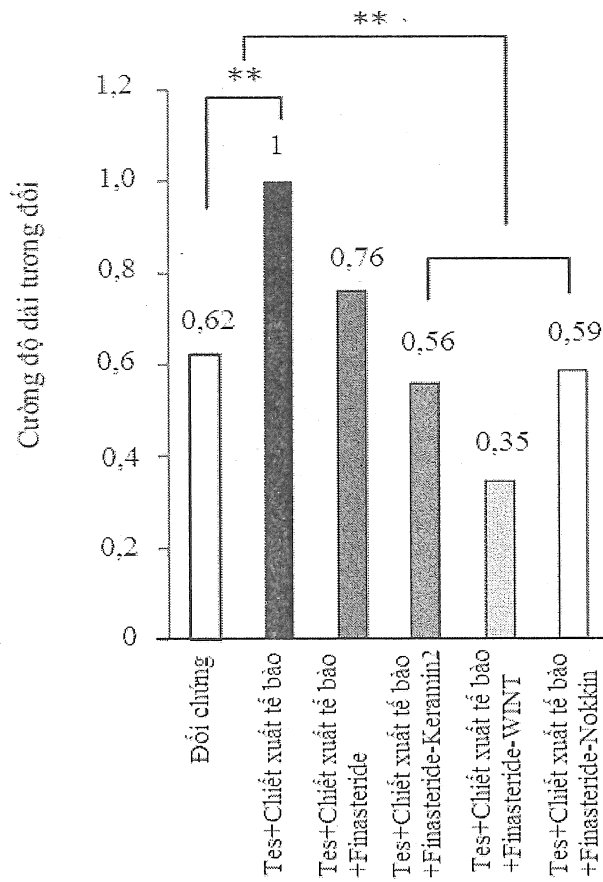


Fig.7b

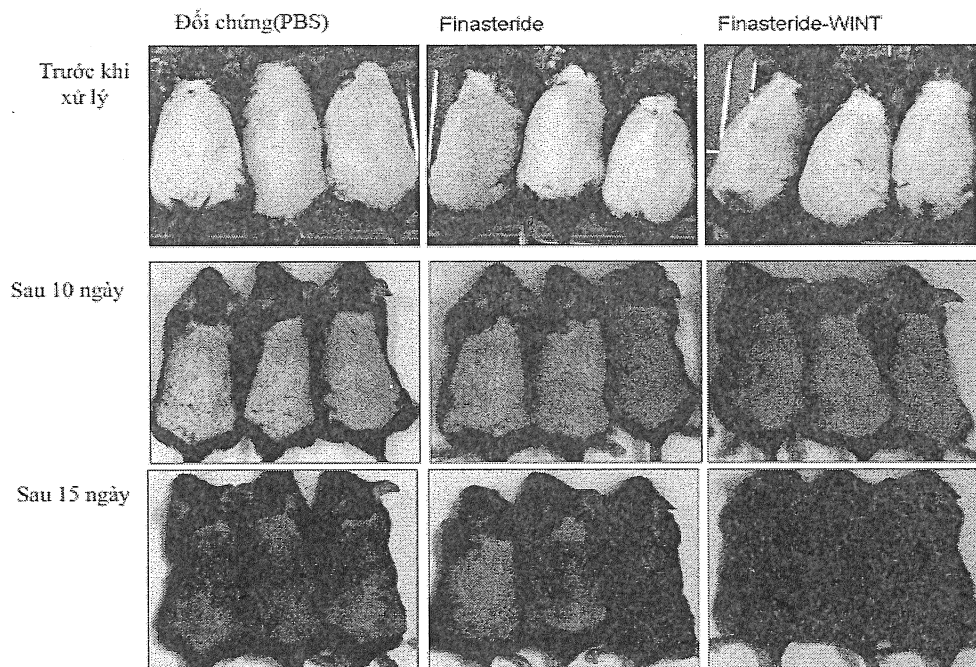
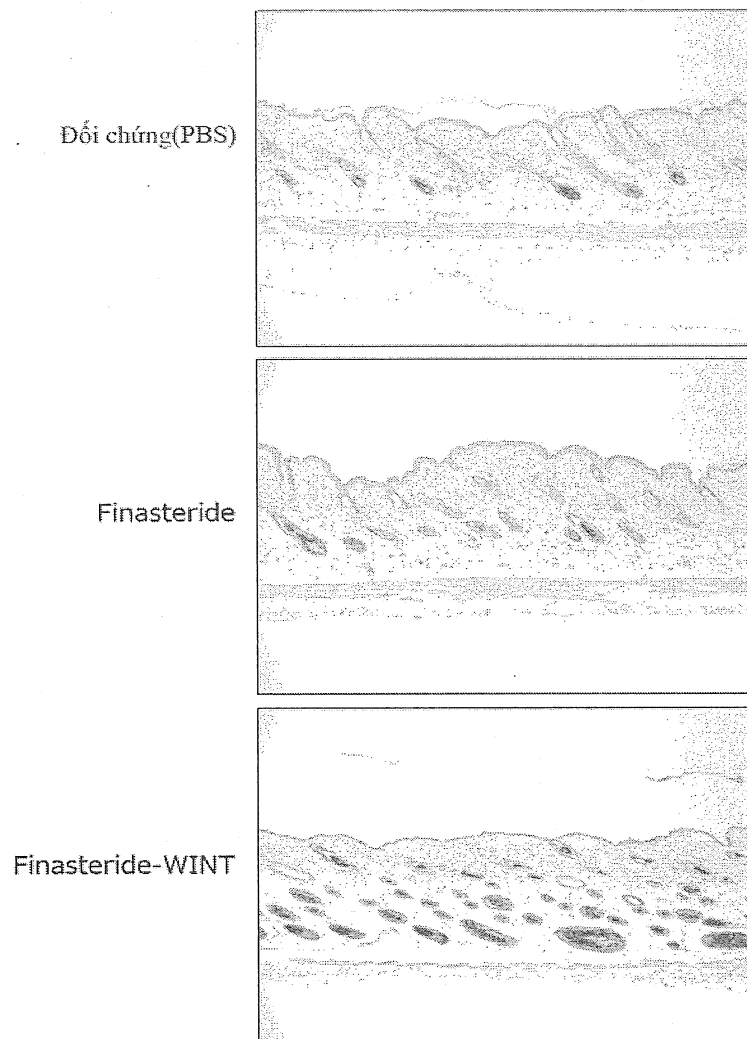
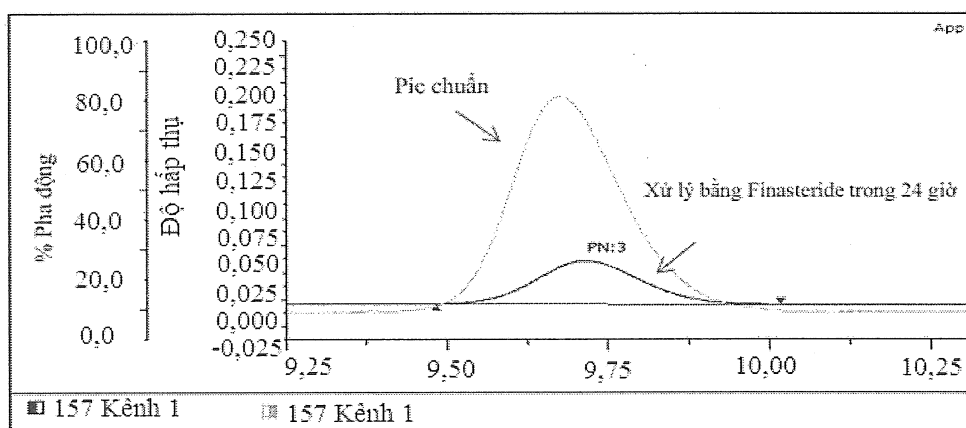


Fig.8a

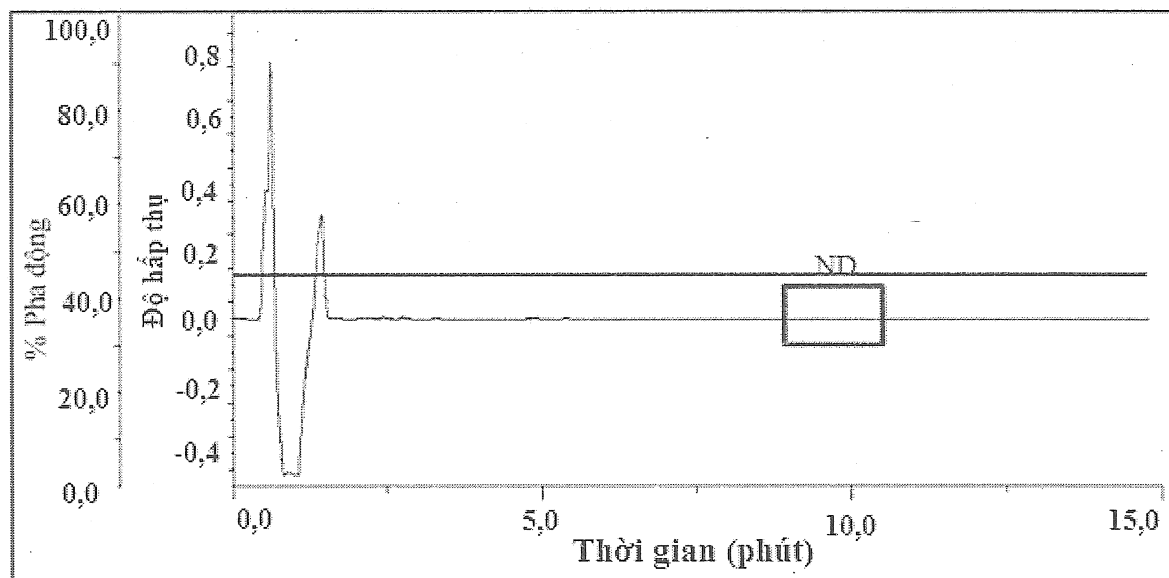
**Fig.8b**

Xử lý bằng Finasteride trong 24 giờ
Phân tích HPLC

**Fig.9a**

Xử lý bằng Finasteride-WINT trong 24 giờ

Phân tích HPLC



LC-MS/Ms

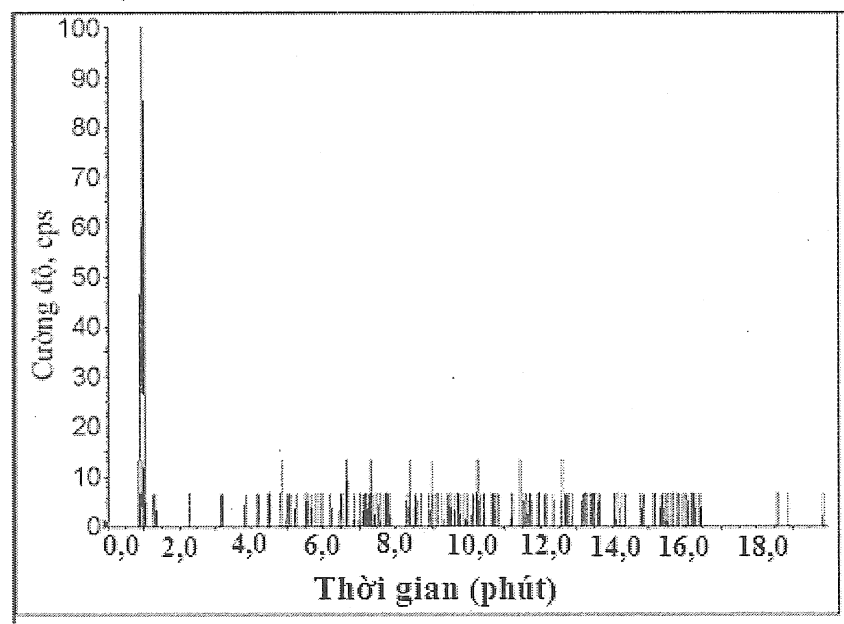


Fig.9b

DANH MỤC TRÌNH TỰ

110 CAREGEN CO., LTD.
 120 THỂ TIẾP HỢP CỦA FINASTERIDE VÀ PEPTIT, DƯỢC PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY
 130 2016-OPA-8117/PCT
 150 KR 10-2016-0032988
 151 2016-03-18
 160 7
 170 KopatentIn 2.0
 210 1
 211 12
 212 PRT
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Peptit Nokkin
 400 1
 Glu Leu Ile Glu His Gly Gly Gly Arg Pro Ala Asp
 1 5 10
 210 2
 211 10
 212 PRT
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Peptit Keramin2
 400 2
 Tyr Lys Ser Lys Lys Gly Gly Trp Thr His
 1 5 10
 210 3
 211 10
 212 PRT
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Peptit WINT
 400 3
 Arg Gln Thr Arg Val Glu Arg Cys His Cys
 1 5 10
 210 4
 211 20
 212 ADN
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Đoạn nối xuôi đặc hiệu DKK-1
 400 4
 tgaatgagtagc tgcgctagtc 20
 210 5
 211 20
 212 ADN
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Đoạn nối ngược đặc hiệu DKK-1
 400 5
 ctcctatgct tggtagacac 20
 210 6
 211 20
 212 ADN
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Đoạn nối xuôi đặc hiệu GAPDH
 400 6
 ggagccaaaa gggtcatcat 20
 210 7
 211 20
 212 ADN
 213 Trình tự nhân tạo
 220
 223 Đoạn nối ngược đặc hiệu GAPDH
 400 7
 gtgatggcat ggactgtggt 20