



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)** (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



2-0004076

(51) **A61Q 7/00; A61K 8/49; C07D 417/12; C07D** (13) **Y**
2022.01 **277/54; A61K 31/4155; A61P 17/14**

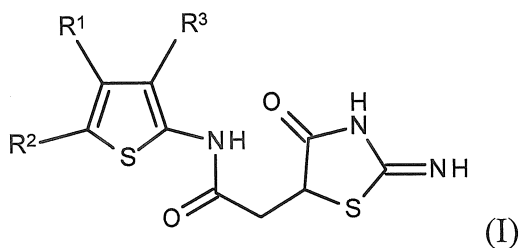
-
- | | |
|--|-------------------------------|
| (21) 2-2024-00565 | (22) 13/02/2019 |
| (67) 1-2020-05246 | |
| (86) PCT/EP2019/053591 13/02/2019 | (87) WO2019/158607 22/08/2019 |
| (30) 102018000002630 13/02/2018 IT | |
| (45) 26/05/2025 446 | (43) 26/04/2021 397A |
| (73) GIULIANI S.P.A. (IT)
Via Palagi, 2 - 20129 MILANO, Italy | |
| (72) GIULIANI, Giammaria (IT); MARZANI, Barbara (IT); PINTO, Daniela (IT);
BARONI, Sergio (IT); PAUS, Ralf (DE); HAWKSHAW, Nathan (GB). | |
| (74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA) | |
-

(54) **CHẾ PHẨM MỸ PHẨM BAO GỒM HỢP CHẤT IMINOXOTHIAZOLIDIN**

(21) 2-2024-00565

(57)

Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm mỹ phẩm bao gồm hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I):



và chất mang sinh lý dụng, trong đó: hợp chất iminooxothiazolidin được chọn từ methyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic và etyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic, và ở lượng từ 0,001 đến 10% theo khối lượng. Chế phẩm này phù hợp với việc dùng tại chỗ để thúc đẩy sự phát triển của tóc và/hoặc ngăn ngừa và/hoặc giảm sự rụng tóc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm để điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc.

Cụ thể là, giải pháp hữu ích bắt nguồn từ lĩnh vực mỹ phẩm cho lông, tóc và dinh dưỡng và liên quan đến chế phẩm bào chế hoặc các chất bổ sung phù hợp để kích thích sự tăng trưởng sinh lý của tóc và ngăn ngừa hoặc điều trị rụng tóc.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tóc có vai trò bảo vệ và được coi như một phần phụ của da cùng với các tuyến bã nhờn, các tuyến mồ hôi và móng.

Vòng đời của bầu tóc (hair bulb) bao gồm ba giai đoạn chính: giai đoạn tăng trưởng được gọi là anagen, giai đoạn ngừng tăng trưởng được gọi là catagen và giai đoạn thoái hóa được gọi là telogen.

Tóc trên da đầu được tạo từ nang tóc, là một cơ quan da của động vật có vú. Các nang tóc không tạo ra tóc liên tục. Chúng quay vòng qua một giai đoạn tăng trưởng có thể kéo dài hai năm hoặc hơn và thoái lui sang giai đoạn thoái hóa trong tối đa hai tháng trước khi bắt đầu mọc lại sợi tóc mới.

Các giai đoạn sinh học của hiện tượng này nằm ở khả năng của tế bào gốc của bầu tóc để thoát khỏi trạng thái nghỉ của chúng ở các bước xen kẽ. Trong giai đoạn tạo góc và tăng trưởng bầu tóc, sự tăng sinh, biệt hóa và các hoạt động sống đang chiếm ưu thế được điều chỉnh bởi các yếu tố tăng trưởng. Ngược lại, ở giai đoạn thoái lui, được đặc trưng bởi sự hoạt hóa con đường phân tử gây chết theo chương trình ở các tế bào bầu tóc.

Trong giai đoạn anagen, phần nhú da tạo tín hiệu hóa học để hoạt hóa và chỉ dẫn cho tế bào gốc của chỗ phình bằng cách di nhập vào chân của nang tóc tạo thành nền tóc. Bằng cách “di nhập” này, tế bào gốc của chỗ phình tạo ra “con đường” tế bào mà làm phát sinh lớp ngoài của chân tóc hoặc ORS.

Để đáp lại các tín hiệu khác bằng phần nhú da, các tế bào nền (matrix cell), có nguồn gốc từ tế bào gốc, tăng sinh và bắt đầu quy trình biệt hóa, bằng cách di chuyển lên trên để tạo thành trục và vỏ bên trong của nang tóc.

Bắt đầu giai đoạn catagen được đặc trưng ở sự kết thúc tăng sinh tế bào và sự chết theo chương trình của tế bào nền. Trong giai đoạn catagen, phần nhú da di nhập vào phần thấp nhất của chỗ phình. Khoảng cách gần này của phần nhú so với chỗ phình được cho là cần thiết để bắt đầu chu kỳ tạo tóc khác. Điều này có thể tương tác/hoạt hóa tế bào chỗ phình ở trạng thái nghỉ và chu kỳ sinh trưởng tóc mới.

Khi chuyển đổi catagen/telogen, một số tế bào của chỗ phình di nhập để gặp phần nhú, tạo thành mầm tóc.

Tóc trong giai đoạn telogen chứa quần thể tế bào ở chân tóc, thực tế được gọi là mầm tóc, nằm gần với phần nhú da. Mầm tóc được hoạt hóa để tăng sinh ở cuối giai đoạn telogen, ngay cả trước khi chỗ phình, tạo thành nền của bầu tóc mới, bằng cách bao quanh phần nhú.

Các yếu tố khác nhau, trong đó căng thẳng, thiếu chất dinh dưỡng và lão hóa, ảnh hưởng tiêu cực đến chu kỳ sống của bầu tóc, xác định sự giảm số lượng tóc và sự mỏng đi của chúng.

Rối loạn tăng trưởng của tóc rất phổ biến đặc biệt là ở nam giới. Nếu coi vai trò của tóc được xem xét ở khía cạnh các mối quan hệ xã hội, sự rụng tóc có thể là khó đối mặt đối với người.

Một trong số rối loạn tóc phổ biến nhất là rụng tóc (alopecia), hội chứng về tăng trưởng tóc có thể do nhiều yếu tố khác nhau từ di truyền cho đến môi trường. Mức độ và kiểu rụng tóc có thể thay đổi, tuy nhiên một trong số dạng rụng tóc phổ biến nhất là rụng tóc androgen (AGA). Các dạng rụng tóc khác mà không phải rụng tóc androgen bao gồm rụng tóc telogen (telogen effluvium), rụng tóc từng mảng, bệnh nấm ringworm, rụng tóc có sẹo, và sự rụng tóc do gia công thừa mỹ phẩm.

Ở các cá thể bị ảnh hưởng bởi rụng tóc androgen (AGA), các nang tóc mà hình thành ở đầu giai đoạn anagen mới giảm kích thước theo thời gian (sự thu nhỏ), dần dần dẫn đến sự hình thành tóc mà nhỏ hơn so với trước đó. Kết quả là tạo thành tóc cực nhỏ.

Các bác sĩ da liễu phân loại bệnh rụng tóc bằng cách chia nhỏ chúng thành các loại bệnh da liễu và không phải bệnh da liễu. Một số loại rụng tóc chẳng hạn như liken phẳng lông, bệnh lupus ban đỏ dạng đĩa và bệnh ghép chống chủ liên quan đến sự phá hủy tế bào gốc của nang tóc ở chỗ phình và liên quan đến sự rụng tóc thường xuyên. Trong số

các bệnh rụng tóc có thể hồi phục chẳng hạn như rụng tóc theo mảng, viêm ảnh hưởng đến các tế bào tiền thân của nang, nhưng không ảnh hưởng đến các tế bào gốc của chúng. Ở các bệnh này, việc mọc lại diễn ra khi loại bỏ được viêm và sự tái tạo sau đó của nang tóc bắt đầu từ tế bào gốc không bị hư hại.

Ở các cá thể mắc chứng rụng tóc androgen (AGA), theo thời gian các nang, được hình thành lại khi bắt đầu giai đoạn anagen mới, có kích thước nhỏ hơn, dẫn đến sự hình thành tóc có đường kính nhỏ hơn so với đường kính ban đầu. Kết quả là, hình thành tóc cực nhỏ.

Quan sát thấy rằng mặc dù teo da đầu, các nang vẫn còn tạo ra các tế bào gốc mà chuyển đổi thành tế bào tiền thân, mặc dù ở mức độ thấp hơn với da đầu ở các điều kiện sinh lý.

Hiện nay có nhiều lựa chọn để điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc, bao gồm cả rụng tóc.

Tuyến điều trị thứ nhất bao gồm dùng tại chỗ và/hoặc dùng chế phẩm để ngăn ngừa và điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc. Hầu hết các chế phẩm tóc trên thị trường nhắm đích bầu tóc và tác động lên chuyển hóa của da đầu, sự cung dưỡng, oxy hóa và vi tuần hoàn cải thiện các điều kiện góp phần vào việc tăng trưởng tóc sinh lý.

Điển hình là, các sản phẩm cho lông tóc này kết hợp với các thành phần mỹ phẩm để phục hồi da và các điều kiện phù hợp để thúc đẩy sự phát triển của tóc.

Một lượng lớn các sản phẩm cho lông tóc chứa các chất chống oxy hóa, chẳng hạn như vitamin E, glycosaminoglycan chẳng hạn như axit hyaluronic, và các vitamin chẳng hạn như vitamin A và các vitamin nhóm B hoặc dẫn xuất của chúng chẳng hạn như niacin hoặc nicotinamid adenin dinucleotit (NAD).

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, việc dùng của các chế phẩm lông tóc chứa các thành phần nói trên và thành phần khác cho da đầu hoặc việc dùng các chế phẩm dinh dưỡng cho thấy có hiệu quả thấp đối với sự kích thích sinh trưởng của tóc.

Các sản phẩm lông tóc chứa các cơ chất có hoạt tính được lý làm thành phần có tác dụng với lông tóc cho thấy hoạt tính ưu việt cho với các chế phẩm bào chế dạng mỹ phẩm/dùng cho lông tóc.

Trong số các sản phẩm dược phẩm này, chế phẩm bào chế chứa minoxidil, thành phần hoạt tính dược lý được cung cấp có hoạt tính giãn mạch, đã biết rõ. Các sản phẩm này thường được bào chế như dung dịch rượu để dùng tại chỗ.

Các sản phẩm khác được sử dụng để điều trị rối loạn tóc bao gồm dược phẩm chứa finasteride, là một cơ chất nội tiết tố. Các sản phẩm này ức chế 5-alpha-reductaza Tuýp II, là một enzyme chuyển hóa testosterone thành dihydrotestosterone (DHT), là một chất nội tiết tố làm co hoặc thu nhỏ nang tóc và dẫn đến hói đầu khi sự bài tiết vượt quá mức sản xuất sinh lý.

Tuy nhiên, việc sử dụng minoxidil và finasteride không tránh khỏi những hạn chế. Đặc biệt là, việc dùng tại chỗ minoxidil có thể dẫn đến tác dụng phụ khu trú chẳng hạn như phát ban da, viêm cục bộ, và tạo ra các tác dụng phụ chẳng hạn như đau đầu, rậm lông, khi dùng finasteride qua đường miệng có thể gây rối loạn nội tiết tố.

Theo đó, vẫn cần có các biện pháp thay thế để điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc một cách hiệu quả và có thể không có tác dụng phụ nghiêm trọng.

Một trong số các mục tiêu của giải pháp hữu bao gồm đề xuất cách sử dụng mới các hợp chất đã biết trong lĩnh vực dùng cho lông tóc.

Một mục đích khác là đề xuất chế phẩm để kích thích sự tăng trưởng tóc sinh lý ở đối tượng bị hói hoặc mỏng tóc.

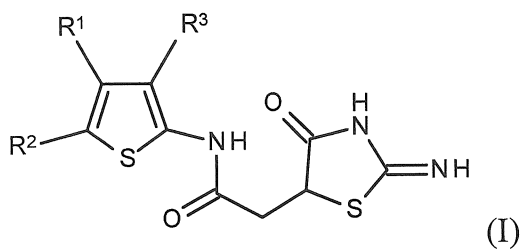
Mục tiêu khác của giải pháp hữu ích là đề xuất chế phẩm được dùng như cả dược phẩm và mỹ phẩm mà có thể được dùng khu trú hoặc theo đường dùng hệ thống.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo thuật ngữ chung, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng mới dẫn xuất của iminoxothiazolidin trong lĩnh vực mỹ phẩm và lông tóc.

Theo các khía cạnh nhất định, các tác giả đã phát hiện ra rằng các dẫn xuất của iminoxothiazolidin nhất định mà là các hợp chất đã biết để sử dụng trong điều trị loãng xương hoặc các rối loạn liên quan đến xương, kích thích tăng trưởng tóc khi dùng khu trú trên da đầu hoặc khi được dùng theo hệ thống.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng làm mỹ phẩm mà không phải để điều trị bệnh của dẫn xuất của iminoxothiazolidin có công thức (I)



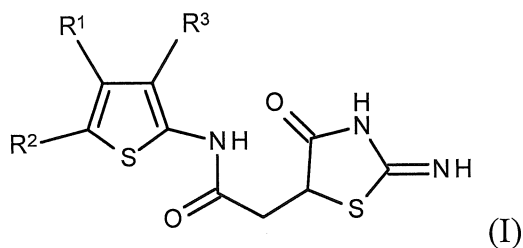
trong đó

R_1 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, xycloalkyl, phenyl, $-\text{CH}_2\text{-NH-phenyl}$;

R_2 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, halogen, phenyl;

R_3 là $\text{COO}(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$, CONR_4R_5 trong đó R_4 và R_5 độc lập là H hoặc C_1 - C_6 alkyl, hoặc R_1 và R_2 cùng nhau tạo thành C_5 - C_7 xycloalkyl được dung hợp với vòng thiophen để điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất dẫn xuất của iminoxothiazolidin có công thức (I)



trong đó:

R_1 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, xycloalkyl, phenyl, $-\text{CH}_2\text{-NH-phenyl}$;

R_2 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, halogen, phenyl;

R_3 là $\text{COO}(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$, CONR_4R_5 trong đó R_4 và R_5 độc lập là H hoặc C_1 - C_6 alkyl, hoặc R_1 và R_2 cùng nhau tạo thành C_5 - C_7 xycloalkyl được dung hợp với vòng thiophen

để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc bệnh tăng trưởng của tóc.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng làm mỹ phẩm của chế phẩm chứa hợp chất có công thức I và chất mang sinh lý dụng để kích thích sự phát triển sinh lý của tóc.

Theo một số phương án, chế phẩm theo giải pháp hữu ích là mỹ phẩm phù hợp để dùng tại chỗ.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm để sử dụng làm mỹ phẩm là mỹ phẩm, thực phẩm bổ sung hoặc chế phẩm dinh dưỡng mà có thể được đưa vào chế độ ăn kiêng cho đối tượng mắc rối loạn lông tóc chẳng hạn như rụng tóc, làm dày tóc hoặc bạc màu.

Các tác giả nhận thấy rằng dẫn xuất của iminooxothiazolidin có công thức (I) khi được dùng tại chỗ hoặc qua đường hệ thống cho đối tượng mắc chứng tóc thưa mỏng hoặc rụng tóc, để làm dày dần các vùng da đầu mỏng hơn.

Theo khía cạnh nhất định, chế phẩm được đề xuất chứa dẫn xuất của iminooxothiazolidin có công thức (I) và chất mang sinh lý dụng để sử dụng trong điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo giải pháp hữu ích là dược phẩm.

Thông thường, chế phẩm theo giải pháp hữu ích chứa lượng có hiệu quả về mặt dược lý hoặc cho lông tóc của dẫn xuất của iminooxothiazolidin có công thức (I).

Các khía cạnh và thuận lợi nhất định theo giải pháp hữu ích sẽ còn mô tả với sự tham chiếu đến hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự tăng 3 đến 6 lần sự biểu hiện gen Lef1 thu được bằng sự kích thích của nó với hai hợp chất theo giải pháp hữu ích được xác định là C1 và C5 trong Ví dụ 4, so với sự biểu hiện thu được bằng chất dẫn thuốc riêng lẻ.

Fig. 2 thể hiện thử nghiệm bổ sung nhằm thể hiện hoạt tính thúc đẩy tăng trưởng tóc của hợp chất iminooxothiazolidin theo giải pháp hữu ích, đặc biệt là chúng được báo cáo trong Bảng I sử dụng dòng tế bào Hair (tế bào nhú da).

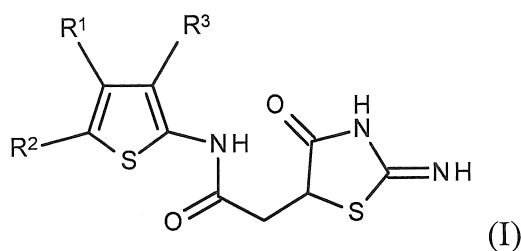
Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo khía cạnh nhất định của giải pháp hữu ích, các tác giả được phát hiện là lớp dẫn xuất của iminooxothiazolidin được chọn có công thức (I) cho thấy có thể ứng dụng trong lĩnh vực lông tóc và hữu dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc.

Các hợp chất có công thức (I) cho thấy ứng dụng được trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc hoặc lông tóc.

Chủ đơn khám phá ra rằng hợp chất có công thức (I) đem lại hoạt tính lông tóc và kích thích hoạt động của tế bào nang và bầu tóc đang nghỉ của da đầu. Những hoạt động này kích hoạt vòng đời của các nang tóc, thúc đẩy sự phát triển của tóc.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng làm mỹ phẩm/không phải để điều trị của hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I)



trong đó

R_1 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, (C_3 - C_6)xycloalkyl, phenyl, $-CH_2$ -NH-phenyl;

R_2 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, halogen, phenyl;

R_3 là $COO(C_1-C_6)$ alkyl, tốt hơn là $COO(C_1-C_3)$ alkyl, $CONR_4R_5$ trong đó R_4 và R_5 độc lập là H hoặc C_1 - C_6 alkyl tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, hoặc R_1 và R_2 cùng nhau tạo thành C_5 - C_7 xycloalkyl được dung hợp với vòng thiophen

để thúc đẩy sự phát triển của tóc hoặc ngăn ngừa hoặc làm chậm sự rụng tóc.

Halogen được ưu tiên là Br.

Theo các phương án nhất định R_1 là H hoặc C_1 - C_3 alkyl, tốt hơn là methyl; R_2 là H, halogen tốt hơn là Br hoặc C_1 - C_3 alkyl tốt hơn là CH_3 và R_3 là $COO(C_1-C_3)$ alkyl tốt hơn là methyl hoặc ethyl este.

Theo phương án nhất định, R_1 là H hoặc C_1 - C_3 alkyl,

R_2 là H hoặc halogen, tốt hơn là Br,

R_3 là $COOCH_3$ hoặc $COOCH_2CH_3$.

Các hợp chất được ưu tiên có công thức (I) có các nhóm thế sau:

R_1 là methyl, R_2 là Br và R_3 là $COOethyl$;

R_1 là methyl, R_2 là H và R_3 là $COOethyl$

R_1 là H, R_2 là H và R_3 là $COOmethyl$

R_1 là $-CH_2-NH-phenyl$, R_2 là Br và R_3 là $COOethyl$.

Theo các phương án nhất định, đề xuất hợp chất có công thức (I) được nêu trong bảng 1 dưới đây, tốt hơn là các hợp chất C1, C5, C7, C17 là các hợp chất có hoạt động hơn, đặc biệt là hợp chất C1 và C5.

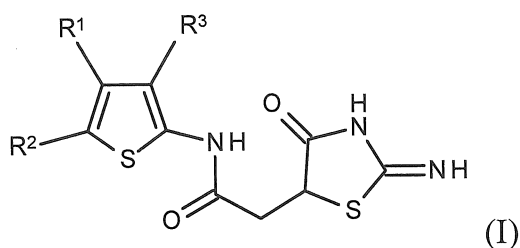
Các hợp chất được ưu tiên nhất là methyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetylamin)-4,5-dimethyl-thiophen-3-cacboxylic và ethyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetylamin)-4,5-dimethyl-thiophen-3-cacboxylic.

Theo giải pháp hữu ích các hợp chất có công thức (I) hữu dụng trong lĩnh vực mỹ phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị sự gãy, rụng tóc, trong việc ngăn ngừa việc bạc tóc hoặc điều trị bằng mỹ phẩm cho tóc bạc. Hợp chất có công thức (I) cũng hữu dụng để cải thiện theo khía cạnh thẩm mỹ cho tóc chẳng hạn như nhuộm màu tóc.

Điển hình là, các hợp chất có công thức (I) kích thích sự tăng trưởng vật lý của tóc và làm dày tóc.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng dược lý các hợp chất có công thức (I) để điều trị rối loạn/bệnh tăng trưởng của tóc.

Theo khía cạnh sau, đề xuất hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I)



trong đó

R_1 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, (C_3 - C_6)xycloalkyl, phenyl, $-CH_2-NH$ -phenyl;

R_2 là H, C_1 - C_6 alkyl mạch thẳng hoặc phân nhánh, tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, halogen, phenyl;

R_3 là $COO(C_1-C_6)$ alkyl, tốt hơn là $COO(C_1-C_3)$ alkyl, $CONR_4R_5$ trong đó R_4 và R_5 độc lập là H hoặc C_1 - C_6 alkyl, tốt hơn là C_1 - C_3 alkyl, hoặc R_1 và R_2 cùng nhau tạo thành C_5 - C_7 xycloalkyl được dung hợp với vòng thiophen

để sử dụng trong điều trị rối loạn hoặc bệnh tăng trưởng của tóc.

Halogen được ưu tiên là Br.

Rối loạn hoặc bệnh tăng trưởng của tóc mà có thể được điều trị theo khía cạnh này của giải pháp hữu ích bao gồm rụng tóc (hói) và rụng tóc kiểu TE (telogen effluvium), các rối loạn ảnh hưởng đến các đối tượng nam và nữ. Chế phẩm cũng phù hợp để điều trị hoặc ngăn ngừa rụng tóc kiểu phụ nữ, hói, hoặc rụng tóc androgen.

Các hợp chất iminoxothiazolidin và các phương pháp điều chế chúng được bộc lộ trong Đơn giải pháp hữu ích quốc tế WO 2006124887 của Wyeth Corp., USA.

Theo khía cạnh thứ ba, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng làm mỹ phẩm, không phải trị bệnh của chế phẩm chứa hợp chất iminoxothiazolidin có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên, và chất mang sinh lý dụng để kích thích sự phát triển sinh lý của tóc. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích có hiệu quả trong ngăn ngừa và/hoặc điều trị các dạng hói hoặc tóc thưa mỏng như mô tả ở trên.

Chế phẩm để sử dụng làm mỹ phẩm có thể dùng khu trú hoặc theo hệ thống.

Theo một số phương án, chế phẩm để dùng qua đường miệng là thực phẩm chức năng, chế phẩm được thực phẩm, sản phẩm ăn kiêng, thực phẩm bổ sung hoặc sản phẩm dinh dưỡng hoặc thiết bị y tế.

Thực phẩm chức năng có nghĩa là thực phẩm được thành phần thực phẩm được biến đổi bất kỳ mà đem lại các lợi ích hoặc sự bảo vệ chống lại nhược điểm hoặc tình trạng sinh lý, bên cạnh các chất dinh dưỡng truyền thống mà nó chứa.

Sản phẩm được thực phẩm có nghĩa là sản phẩm được phân lập hoặc tinh chế từ các cơ chất có thể ăn được. Sản phẩm được thực phẩm là khi nó cho thấy là có lợi ích sinh lý hoặc đem lại sự bảo vệ chống lại nhược điểm hoặc tình trạng sinh lý.

Độc lập với đường dùng, mỹ phẩm làm tăng khả năng tồn tại của tế bào nang trong giai đoạn anagen và hoạt hóa các tế bào im lặng (quiescent cell) của da đầu bằng cách kích thích sự trao đổi chất của các nang và sự tăng trưởng của tóc mới.

Theo khía cạnh thứ tư, chế phẩm được đề xuất chứa hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án mô tả ở trên, và chất mang được dùng để sử dụng trong điều trị rối loạn tăng trưởng của tóc.

Ví dụ về rối loạn tăng trưởng của tóc được điều trị bằng các chế phẩm này bao gồm hói và rụng tóc kiểu TE. Điển hình là, các chế phẩm này được bào chế ở dạng được phẩm.

Lượng hợp chất hoạt tính có công thức (I) trong chế phẩm để sử dụng làm mỹ phẩm/dược phẩm/dinh dưỡng là lượng mà thu được liều dùng có hiệu quả trị bệnh hoặc phòng ngừa.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm để sử dụng làm mỹ phẩm và cho y khoa có thể chứa hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I) ở lượng 0,0001 đến 15% theo trọng lượng, 0,001 đến 10 theo trọng lượng hoặc 0,1 đến 3% theo trọng lượng.

Theo phương án nhất định, chế phẩm theo giải pháp hữu ích còn bao gồm một hoặc nhiều thành phần bổ sung có hoạt tính cho lông tóc.

Lượng được dùng và tần suất dùng chế phẩm sẽ phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của tình trạng lông tóc được điều trị.

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm sử dụng làm mỹ phẩm và điều trị bệnh còn bao gồm các thành phần bổ sung chẳng hạn như các vitamin, ví dụ vitamin A, vitamin C, vitamin nhóm B, niacin.

Theo một số phương án, chế phẩm theo giải pháp hữu ích còn chứa axit amin, cụ thể là axit amin chứa lưu huỳnh, chẳng hạn như L-cystein hoặc L- Methionine, đặc biệt là đối với chế phẩm bào chế dùng qua đường miệng.

Theo một số phương án, chế phẩm theo giải pháp hữu ích cũng bao gồm một hoặc nhiều chất dinh dưỡng vi lượng và/hoặc kháng chất chẳng hạn như Mg, Zn, Ca, Fe, Cr, Se, và các chất khác, đặc biệt là đối với chế phẩm vào chế để dùng qua đường miệng.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm còn chứa các cơ chất bổ sung chẳng hạn như axit folic, canxi pantotenat, mucopolysaccarit chẳng hạn như axit hyaluronic, hoặc dẫn xuất của đậu nành chẳng hạn như isoflavon đậu nành.

Theo một số phương án, chế phẩm theo giải pháp hữu ích sử dụng làm mỹ phẩm và cho y khoa chứa chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng và/hoặc sinh lý dụng.

Diễn hình là, chất mang sinh lý dụng của chế phẩm theo giải pháp hữu ích là tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng phù hợp với dùng tại chỗ và/hoặc dùng hệ thống. Chất mang sinh lý hoặc dược lý có thể thể là cùng một chất mang.

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, thuật ngữ "chất mang" đề cập đến tá dược, chất mang, chất pha loãng hoặc chất hỗ trợ có thể có mặt trong chế phẩm theo giải pháp hữu ích. Chất mang và/hoặc tá dược bất kỳ phù hợp đối với dạng điều chế mong muốn để dùng được dự tính trong việc sử dụng chiết xuất thực vật hoặc thành phần hoạt tính được mô tả ở đây có mặt trong đó.

Diễn hình là, chất mang phù hợp là chất mang sinh lý dụng, có thể ăn được hoặc được dùng.

Diễn hình là, chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể chứa một hoặc nhiều chất mang có thể ăn được.

Với các mục đích này của giải pháp hữu ích, thuật ngữ “có thể ăn được” dùng để chỉ nguyên liệu là thực phẩm mà được cho phép bởi cơ quan có thẩm quyền để sử dụng

trong các ứng dụng thực phẩm hoặc dinh dưỡng. Thuật ngữ “rối loạn lông tóc” có nghĩa là tình trạng bất kỳ mà ở đó có sự thay đổi về tình trạng sinh lý của tóc, đặc biệt là thay đổi về khía cạnh thẩm mỹ của tóc. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích bao hàm chế phẩm bất kỳ được tạo bằng cách trộn kết hợp hợp chất có công thức (I) và chất mang sinh lý dụng. Các chế phẩm này phù hợp đối với việc sử dụng làm dinh dưỡng, dược phẩm hoặc để ăn kiêng ở động vật có vú, cụ thể là người.

Chất mang có thể có nhiều dạng phù hợp khác nhau phụ thuộc vào dạng bào chế mong muốn cho cả việc dùng hệ thống hoặc cục bộ.

Theo đó, chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược sinh lý dụng và/hoặc dược dụng, có thể được chọn trên cơ sở đường dùng dự định cho chế phẩm.

Các chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể ở dạng rắn hoặc lỏng.

Chế phẩm dùng tại chỗ ở dạng rắn bao gồm viên nén, viên nang, bột, hạt, viên tròn. Nếu cần, viên nén có thể được phủ bằng chất polyme phù hợp hoặc chất để đem lại việc giải phóng duy trì/kéo dài bằng kỹ thuật thông thường.

Các tá dược điển hình được sử dụng ở dạng rắn bao gồm các dẫn xuất của xenluloza chẳng hạn như hydroxymetyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, metylxenluloza, hydroxypropyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza, carboxyetyl xenluloza, etylhydroxyetyl xenluloza, xenluloza axetat butyrat, xenluloza axetat phthalat, và hỗn hợp của chúng.

Các ví dụ khác về tá dược phù hợp bao gồm các polyme thuộc họ lactam, điển hình là pyrrolidon và các dẫn xuất của chúng, chẳng hạn như polyvinylpyrrolidon, polyvinylpolypyrrolidon và hỗn hợp của chúng, các muối vô cơ ví dụ như canxi hoặc dicanxi phosphat, tá dược trơn ví dụ là magie stearat, triacylglycerol và hỗn hợp của chúng.

Viên nén, viên tròn, viên nang, và tương tự cũng bao gồm chất gắn kết chẳng hạn như gôm tragacanth, acacia, tinh bột ngô hoặc gelatin; tá dược chẳng hạn như dicanxi phosphat; chất gây rã chẳng hạn như tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, axit alginic; tá dược trơn chẳng hạn như magie stearat; và chất làm ngọt chẳng hạn như sucroza, lactoza, saccharin hoặc chất làm ngọt khác. Khi dạng liều đơn vị là viên nang, nó có thể chứa, ngoài các vật liệu ở trên, chất mang lỏng chẳng hạn như dầu béo.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo giải pháp hữu ích còn bao gồm một hoặc nhiều thành phần bổ sung, chẳng hạn như chất bổ trợ, chất làm đầy, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất tạo kết cấu, chất tạo màng sinh học, chất làm dẻo, chất làm ướt và chất làm dày.

Các vật liệu khác có thể có mặt làm lớp phủ hoặc để biến đổi dạng vật lý của liều đơn vị. Ví dụ, viên nén có thể được phủ bằng senlac, đường hoặc cả hai. Xi rô hoặc cồn ngọt có thể chứa, ngoài thành phần hoạt tính thành phần hoạt tính, sucroza làm chất làm ngọt, metyl và propylparaben làm chất bảo quản, thuốc nhuộm và tạo hương vị chẳng hạn như vị anh đào hoặc cam. Để ngăn ngừa sự cố trong quá trình di chuyển phía trên của đường tiêu hóa, chế phẩm là chế phẩm bào chế được phủ dùng cho ruột.

Các chế phẩm điển hình ở dạng lỏng để dùng qua đường miệng bao gồm dung dịch, huyền phù, xiro, nhũ tương, keo.

Trong các cách dùng này, các chất mang phù hợp bao gồm nước, glycol, hoặc nhũ tương nước tan trong dầu hoặc dầu tan trong nước chứa hợp chất có công thức (I) phân tán trong đó.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được dùng bằng đường hệ thống, đặc biệt là bằng cách tiêm. Trong chế phẩm dùng để tiêm, hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó được hòa tan trong dung môi được dùng chẳng hạn như nước để tiêm. Chế phẩm dùng để tiêm còn có thể bao gồm ít nhất một chất đệm/hệ chất đệm, chất bảo quản, đồng dung môi hoặc chất bổ trợ.

Theo một số phương án, đường dùng chế phẩm theo giải pháp hữu ích là tại chỗ. Chế phẩm để dùng tại chỗ có thể ở dạng rắn, bán lỏng hoặc lỏng. Điển hình là, chế phẩm tại chỗ được dùng lên da, và cụ thể là lên da đầu lượng có hiệu quả.

Ví dụ, đối với sử dụng làm mỹ phẩm, lượng có hoạt tính mỹ phẩm của chế phẩm theo giải pháp hữu ích có thể được áp dụng trực tiếp lên da đầu một lần hoặc nhiều lần một ngày thuận lợi cho chu kỳ kéo dài 2-3 tháng, xen kẽ với thời gian nghỉ.

Chế phẩm để dùng tại chỗ có thể ở dạng rắn, bán rắn hoặc lỏng.

Chế phẩm bào chế phù hợp ở dạng rắn bao gồm kem, keo, hồ, thuốc mỡ.

Theo các phương án khác, chế phẩm bào chế để dùng khu trú ở dạng lỏng, ví dụ ở dạng nước thơm, gel, dầu gội, huyền phù, nhũ tương.

Trong trường hợp chế phẩm bào chế ở dạng lỏng hoặc bán lỏng, hợp chất có công thức (I) được pha loãng trong chất mang ở dạng lỏng sinh lý dụng chẳng hạn như nước, rượu, dung dịch rượu hydro hoặc glyxeric hoặc được trộn với các chất lỏng phù hợp để dùng cục bộ.

Ở dạng dung dịch, huyền phù hoặc thể phân tán, chế phẩm theo giải pháp hữu ích có thể chứa từ khoảng từ 1 đến 99,9% chất lỏng chẳng hạn như nước tùy ý trộn với rượu. Theo một số phương án, nước có mặt ở lượng từ 5 đến 95%. Theo các phương án khác, nước có mặt ở lượng từ 10 đến 90% theo trọng lượng.

Chế phẩm điển hình để dùng tại chỗ là dung dịch rượu hydro chứa hợp chất có công thức (I) được hòa tan trong đó.

Ví dụ, chế phẩm theo giải pháp hữu ích ở dạng lỏng có thể được điều chế bằng cách hòa tan thành phần tan trong nước và các thành phần còn lại trong rượu sau đó hòa các phần khác nhau lại bằng cách khuấy. Sau đó hỗn hợp tạo thành có thể được đệm thêm để đạt được khoảng pH thuận tiện được chọn từ 5 đến 7 để tương thích với pH của da đầu để sau đó được lọc và đóng gói trong vật chứa phù hợp chẳng hạn như chai hoặc lọ.

Theo các phương án nhất định chế phẩm theo giải pháp hữu ích ở dạng lotion để dùng ngoài da.

Điển hình là, các hợp chất hoạt tính có công thức (I) của dược phẩm được bào chế ở dạng liều đơn vị. Liều đơn vị có thể chứa từ 0,1 đến 1000mg thành phần hoạt tính mỗi liều đơn vị để dùng hàng ngày.

Theo một số phương án, lượng có hiệu quả cho chế phẩm bào chế sẽ phụ thuộc vào độ nghiêm trọng của rối loạn hoặc tình trạng cần được điều trị. Theo một số phương án, liều lượng ở khoảng từ 0,001% theo khối lượng đến khoảng 60% theo khối lượng của chế phẩm bào chế.

Theo khía cạnh nhất định, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm để dùng tại chỗ mà hữu dụng trong việc kích thích nang tóc, với hiệu quả đem lại trong rối loạn tăng trưởng của tóc, chẳng hạn như rụng tóc theo mảng, đặc biệt là ở nữ giới. Phương pháp

điều trị cho quần thể liên quan cũng là dấu hiệu của giải pháp hữu ích.

Theo khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp điều trị bằng mỹ phẩm mà bao gồm việc dùng cho da đầu lượng có hiệu quả của chế phẩm ở dạng mô tả trên.

Ví dụ, để dùng cục bộ, lượng có hiệu quả được lý hoặc làm mỹ phẩm của chế phẩm theo giải pháp hữu ích được dùng trực tiếp cho da đầu một hoặc nhiều lần hàng ngày, thuận tiện với chu kỳ kéo dài 2-3 tháng xen kẽ với thời gian nghỉ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ sau được đưa ra chỉ nhằm minh họa giải pháp hữu ích mà không phải để giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích như yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Ví dụ 1

Viên nén để dùng qua đường miệng chứa hợp chất có công thức (I) để kích thích tăng trưởng tóc

Thành phần	Định lượng (mg)
Xenluloza vi tinh thể	60 – 120
Hydroxypropylmetylxenluloza K100	20 – 60
Etyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetylamino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic	5 - 30
Magie stearat	5 - 10
Silicon dioxit	10 – 20
Polyvinylpyrrolidon K30	5 – 10
Axit hyaluronic	0,5 – 2,0
Polyetylen glycol	5 – 10
Axit methacrylic - Metyl Methacrylat Copolyme	10 - 20

Trietyl Xitrat	1,5 - 3
Polysorbate 80	0,5 – 1,0
Titanium đioxit	1,5 - 2,5
Talc	3 - 6

Ví dụ 2

Nước thơm để dùng tại chỗ chứa hợp chất có công thức (I) để kích thích tăng trưởng tóc

Thành phần	định lượng (mg)
Aqua	1350 - 1850
Hydroxypropyltrimonium hyaluronat	1,3 - 3,8
Etanol	1900 - 2600
Metyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic	0,01 – 1,00
Axit lactic 80%	7 – 10
Dầu thầu dầu được hydro hóa PEG-40	35 – 45
Octadexyl di-t-butyl-4-hydroxyhydrocinnamat	1,5 - 2,0
Lexithin	1,5 - 2,0
Fomblin HC/PU-CAT5	0,6 - 0,8

Ví dụ 3

Chế phẩm để dùng tại chỗ chứa hợp chất có công thức (I) để điều trị rụng tóc

Thành phần	Định lượng (mg)
Nước	940 – 2800
Etanol	900-1800
Hydroxypropyltrimonium hyaluronat	3 - 4
Axetyl L-carnitine hydroclorua	17 – 23
Cafein	2 – 3
L-Arginin hydroclorua	2 – 3
Canxi Pantothenat	6,5 - 8, 5
Metyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic	0,01 – 1,00
Axit lactic 80%	2 – 3
Biotin	0,5 -0,8
Dầu thầu dầu được hydro hóa PEG-40	700 – 1000
Lexithin	17 – 23
Dầu thơm	2,0 – 2,5
chiết xuất khô của Ajuga Reptans	8,5 - 11,5
Fomblin HC/PU-CAT5	0,7 - 1,1

Ví dụ 4

Bằng chứng thực nghiệm.

Bằng chứng về hoạt tính của hợp chất theo giải pháp hữu ích được đem lại bằng sự biểu hiện của nhân tố gắn kết chất tăng cường (Lymphoid enhancer binding

factor-1 - Lef1), mà đóng vai trò quan trọng trong việc tăng trưởng tế bào và biệt hóa tế bào gốc ở chỗ phình (International Journal of Medical Sciences 2013; 10(6):738-746).

Các hợp chất thử nghiệm

Hợp chất được thử nghiệm là:

C1: metyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic

C5: etyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic.

Các sản phẩm này được tái cấu trúc trong DMSO (dung dịch gốc) và chất trung gian hoặc dung dịch hoạt động được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch gốc hoặc trung gian trong môi trường William's E.

Nuôi cấy hữu cơ nang tóc (HF)

HF của da đầu ở anagen của người được vi phẫu (được cấy ở 37°C bằng CO₂ 5% trong môi trường tối thiểu là môi trường William's E (Gibco, Life Technologies) được bổ sung L-glutamine 2mM (Gibco), hydrocortison 10ng/ml (Sigma-Aldrich), insulin 10µg/ml (Sigma-Aldrich) và hỗn hợp penixilin/streptomycin 1% (Gibco) để tạo môi trường Williams Complete (WCM) như được mô tả trong (Philpott et al., 1990; Kloepper et al., 2010; Langan et al., 2015). Sau 24 giờ, môi trường này được thay bằng môi trường sạch chứa WCM chứa nồng độ cuối là 0,1% DMSO (chất dẫn) hoặc hợp chất thử nghiệm ở nồng độ cuối là 15µM đối với C1 & C5. Đối với qRT-PCT, ARN được tách chiết từ nang tóc được xử lý chỉ trong 6 giờ.

Phân tích qRT-PCR

ARN được chiết từ nang tóc bằng kit RNeasy (Qiagen, USA), và được phiên mã ngược bằng kit tổng hợp Tetro cADN (Bioline) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. qPCR được tiến hành trong QuantStudio3 (Thermo Fisher) bằng mẫu dò Taqman đối với Axin2 (Hs00610344_m1, Thermo Fisher), Lef1 (Hs01547250_m1, Thermo Fisher), b-actin (Hs01060665_g1, Life Technologies) và Gapdh (Hs02758991_g1, Thermo Fisher). Mức độ biểu hiện được đo bằng phương pháp delta-delta CT.

Kết quả

Lef-1 (biểu hiện gen)

Bảng sau đây cho thấy sự biểu hiện gen Lef1 (mARN) trong nang được cắt nhỏ xử lý bằng chất dẫn, C1 và C5.

Biểu hiện Lef1 được chuẩn hóa theo mức trung bình của gen giữ nhà (GAPDH).
N=8 HF/nhóm từ 1 vật cho.

	Chất dẫn	C1	C5
Trung bình	1	3,425	6,134
SEM	0,01	0,251	0,326

Sự biểu hiện hợp chất C1 và C5 thể hiện sự tăng 3 đến 6 lần so với sự biểu hiện thu được chỉ bằng chất dẫn.

Các kết quả được minh họa trong Fig. 1.

Ví dụ 5 (FIG. 2)

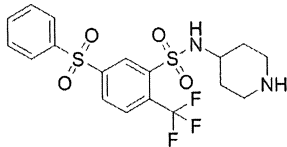
Các thử nghiệm bổ sung nhằm đánh giá hoạt tính thúc đẩy tăng trưởng tóc của hợp chất iminoxothiazolidin theo giải pháp hữu ích, đặc biệt là các hợp chất được nêu trong bảng I.

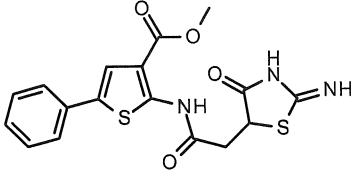
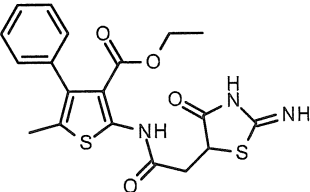
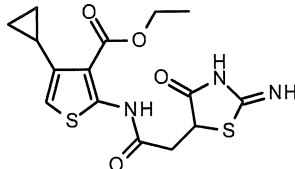
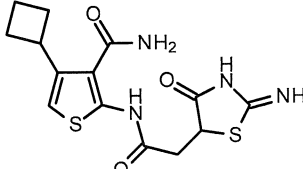
Trong thử nghiệm này, dòng tế bào Hair (các tế bào nhú da) được sử dụng mà không phải nang tóc của người, như trong thực nghiệm ở ví dụ 4.

Chúng tôi đánh giá sự kích thích của Lef1 (gen chỉ thị tăng trưởng tóc) và chúng tôi tái thử nghiệm hợp chất 1 và hợp chất 5 và chúng tôi cũng sử dụng hợp chất WAY-316660, chất đối vận đặc hiệu không độc tương đối của SFRP1, đã được sử dụng để điều trị loãng xương, đối với hoạt tính thúc đẩy tăng trưởng tóc đã biết của nó (Rif. Hawkshaw et al. Plos Biol, 2018;

<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003705>).

Bảng I. Hợp chất thử nghiệm

Hợp chất	Công thức
Way 316606 (đối chứng dương)	
Hợp chất 1 (C1) metyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetylamino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic	
Hợp chất 5 (C5) (Thay thế hợp chất 1 trong R ³ trên khung thiophen)	
Hợp chất 7 (C7) (Thay thế hợp chất 1 trong R ² -R ³ trên khung thiophen)	
Hợp chất 17 (C17) (Thay thế hợp chất 1 trong R ¹ -R ² trên khung thiophen)	

Hợp chất 18 (C18) (Thay thế hợp chất 1 trong R¹-R² trên khung thiophen)	
Hợp chất 20 (C20) (Thay thế hợp chất 1 trong R¹-R³ trên khung thiophen)	
Hợp chất 21 (C21) (Thay thế hợp chất 1 trong R¹(xycloalkyl group)-R³ trên khung thiophen)	
Hợp chất 24 (C24)	

Mẫu sinh học

Tế bào nhú da nang tóc của người (Human Follicle Dermal Papilla Cell - HFDPC)

Human Follicle Dermal Papilla Cell (HFDPC) được bán bởi Promocell (Germany).

Dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường Follicle Dermal Papilla Cell trong bình nuôi cấy 25 cm² ở 37°C, CO₂ 5%. Every two days confluent cultures were splitted 1:3 – 1:6, sau đó rửa bằng PBS 1X (mà không có Ca²⁺ và Mg²⁺), sử dụng Trypsin/EDTA và cấy tế bào ở 2-5·10⁴ tế bào/cm², 37°C, 5% CO₂.

Môi trường đông lạnh: Cryo-SFM. Định lượng tế bào: thử nghiệm màu xanh trypan

Đối chứng

Đối chứng dương: Way316606

Đối chứng âm: Các tế bào không được xử lý trong Follicle Dermal Papilla Cell trong điều kiện nuôi cấy mẫu giống nhau.

Phương pháp

Sự biểu hiện LEF1 được đo bằng RT-PCR. Phân tích này được tiến hành theo phương pháp đã được báo cáo (Gibson et al, 1996; Heid et al, 1996) sử dụng TaqMan Gene Expression Assay được cung cấp bởi Applied Biosystems. Ngắn gọn là, trong cặp mỗi oligonucleotit PCR đặc hiệu gen, mẫu dò oligonucleotit được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang chỉ thị (FAM) ở đầu 5' và thuốc nhuộm huỳnh quang làm tắt (TAMURA) ở đầu 3' được thiết kế. Khi mẫu dò còn nguyên vẹn, sự phát xạ của thuốc nhuộm chỉ thị được chấm dứt. Trong pha kéo dài của chu trình PCR, hoạt tính nucleolytic của ADN polymeraza làm tách mẫu dò lai hóa và giải phóng thuốc nhuộm chỉ thị từ mẫu dò này. Cường độ huỳnh quang được tạo trong khi khuếch đại PCR được kiểm soát bằng máy dò trình tự trực tiếp trong ống phản ứng (“thời gian thực”). Một thuật toán máy tính so sánh lượng phát xạ của thuốc nhuộm chỉ thị với phát tán của thuốc nhuộm chấm dứt và đo số chu kỳ ngưỡng (CT) khi các tín hiệu đạt đến mười lần độ lệch chuẩn của đường cơ sở, từ đó thu được mức độ mARN được phiên mã từ các gen khác nhau được thử nghiệm (Gibson et al, 1996).

Phân tích biểu hiện gen bao gồm bốn bước sau đây:

1. Xử lý tế bào bằng hợp chất hoạt tính trong 24h;
2. Chiết ARN;
3. Phiên mã retro cDNA;
4. RT-PCR định lượng;

Ngày 1: Cấy tế bào

Khi các tế bào (Human Follicle Dermal Papilla Cells) đạt đến mức xấp xỉ 80% bề mặt đĩa nuôi, chúng được thu hoạch bằng trypsin/EDTA và cấy tế bào ở mật độ 1×10^6 tế bào/ml vào đĩa 12 giếng và sau đó ủ ở 37°C , 5% CO_2 (24h).

Ngày 2-3: Phơi nhiễm hóa học 24 h

Khi các tế bào đạt đến xấp xỉ 80% bề mặt đĩa nuôi, môi trường hoàn chỉnh được loại bỏ; các tế bào được rửa một lần bằng PBS 1X và ủ trong Human Follicle Dermal Papilla Cells ở 37°C , 5% CO_2 trong ít nhất 24h;

Hợp chất được thử nghiệm (WAY316606, 1, 5, 7, 17, 18, 20, 21, 24) được hòa tan trong DMSO và pha loãng ở nồng độ cuối trong Human Follicle Dermal Papilla Cells.

Các đối chứng (có có môi trường) cũng được bao gồm.

Sau đó các tế bào được ủ ở 37°C , CO_2 5% trong 24h.

Chiết ARN

ARN tổng được chiết từ các tế bào sử dụng Tri Reagent (Thermo Fisher), đó là dung dịch đơn, đồng nhất để phân lập ARN tổng. Quy trình này là sự cải tiến của phương pháp một bước được báo cáo bởi Chomczynski and Mackey, 1995) để phân lập ARN tổng. Tri Reagent, là hỗn hợp của guanidin thioxyanat và phenol trong dung dịch một pha, hòa tan hoàn toàn ADN, ARN, và protein khi đồng nhất hóa hoặc ly giải mẫu mô và chứa tổ hợp duy nhất gồm chất làm biến tính và các chất ức chế RNaza và được sử dụng trong quy trình phân rã/ phân tách một bước thuận tiện.

Độ tinh sạch của ARN tổng chiết được đo bằng cách đọc hệ số hấp thụ ở 260nm, λ tại đó axit nucleic có hệ số hấp thụ cao nhất. Hệ số hấp thụ cũng được đọc ở 280nm, để đánh giá to độ nhiễm tạp bởi protein hoặc phenol. Trong khi đo hệ số hấp thụ ở bước sóng 230nm và 330nm đem lại thông tin về độ tinh sạch của cả mẫu và cuvet. ARN được xem là có chất lượng tốt nếu tỷ lệ $R=A_{260}/A_{280} > 1,6$.

Sau khi xác định được nồng độ ARN tổng và độ tinh sạch, mỗi mẫu ARN được pha loãng trong nước DEPC đến nồng độ cuối là 2 μ g/ml. Đây là nồng độ cần thiết với bộ kit phiên mã ngược (trong pha sau đó).

Cũng tiến hành chạy điện di gel để xác định độ nguyên vẹn của ARN tổng chiết được.

PCR phiên mã ngược

ARN tổng, được chiết và định lượng, được khuếch đại bằng cách sử dụng bộ thuốc thử “PRIME SCRIPT RT (Perfect Real time) (Takara).

Các mẫu ngẫu nhiên được sử dụng để đảm bảo việc tổng hợp hiệu quả sợi mARN thứ nhất.

Để khuếch đại chúng tôi sử dụng Real time PCR System Mx3000P (Stratagene) và mẫu ARN tổng được khuếch đại hai lần.

Điều kiện khuếch đại	Bước 1:	Bước 2:	Bước 3:
Nhiệt độ	37° C	85°C	25° C
Thời gian	15 phút	5 giây	Giữ

Sau khi các mẫu khuếch đại được rửa giải bằng amplification 30 μ l nước DEPC và lưu trữ ở -20°C cho tới khi sử dụng.

Real Time PCR

Phân tích RT-PCR được thiết lập, sử dụng mẫu dò tuyến tính TaqMan (Applied Biosystems). Những mẫu dò này là kỹ thuật hóa học phát hiện được sử dụng và công bố phổ biến nhất và trong các ứng dụng qPCR.

Mẫu dò và đoạn môi kiểm kê (inventoried) được chọn theo các nghiên cứu cụ thể trước đây.

Chúng tôi sử dụng phương pháp định lượng tương đối trong đó nồng độ tương đối trong gen quan tâm (đích) trong mẫu không xác định được so sánh với mẫu chuẩn, hoặc mẫu đối chứng (tế bào không được xử lý). Tại đây, mẫu ủ là dòng cơ sở cho biểu hiện của gen đích xác định. Sử dụng phương pháp này, độ chênh lệch trong giá trị Ct giữa mẫu không xác định và mẫu chuẩn được thể hiện như cấp số tỷ lệ (fold-changes) so với mẫu chuẩn. Ngoài việc so sánh sự biểu hiện của gen đích riêng lẻ trong mẫu thực nghiệm so với đối chứng, rất hữu ích khi chuẩn hóa kết quả với mục tiêu chuẩn hóa, thông thường gen mà sự hiện của nó là cố định ở cả mẫu đối chứng và thử nghiệm. GAPDH là gen giữ nhà (housekeeping gene) được sử dụng để chuẩn hóa kết quả. Sử dụng loại định lượng này, không cần chạy đường tiêu chuẩn trên mỗi đĩa, đánh giá độ hiệu quả khuếch đại là 100%. Thử nghiệm biểu hiện gen TaqMan được cung cấp bởi Applied Biosystems được tối ưu hóa đối với biên dạng nhiệt sau và độ hiệu quả 100%.

Các gen sau được nghiên cứu:

Tên gen	Đánh giá TAQMAN ID	Chương trình khuếch đại
GAPDH (giữ nhà)	Hs99999905_m1	95°C 15s
		60°C 60s
		Trong 40 chu kỳ
LEF1	Hs01547250_m1	95°C 15s
		60°C 60s
		Trong 40 chu kỳ

Quy trình thí nghiệm

RT-PCR được tiến hành bằng cách sử dụng cADN từ các tế bào được xử lý ở các mốc thời gian khác nhau, tế bào đối chứng (không được xử lý) được thêm vào 10 μ l 2X TaqMan Gene Expression Master Mix và 1 μ l 20X TaqMan Gene Expression assay. Mỗi mẫu sinh học được xử lý hai lần và khuếch đại ở cả đánh giá biểu hiện gen TaqMan giữ nhà và đánh giá biểu hiện gen TaqMan nhắm đích. Ngoài ra, mẫu đối chứng không có khuôn (NCT) được bao gồm trong mỗi lần chạy.

Máy luân nhiệt Stratagene MX3000P đã được lập trình như sau:

- 95°C, 30 giây (Hoạt hóa Amplitaq);
- 95°C, 5 giây (Biến tính)
- 60°C, 20 giây (Ủ - Kéo dài)

Bước	Bước 1: Hoạt hóa Taq Polymeraza	Bước 2: PCR	
	Hold	Chu kỳ (40 chu kỳ)	
		Biến tính	Ủ/Kéo dài
Nhiệt độ	95°C	95° C	60° C
Thời gian	30 giây	5 giây	20 giây

Thu dữ liệu

Dữ liệu được cung cấp bởi thiết bị Stratagene MX3000P được đăng ký bằng phần mềm nội bộ MXPro v.4.01. Khi hoàn thành việc khuếch đại, phần mềm này sẽ áp dụng tự động phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ đo độ chênh lệch C_t giữa gen đích trong các mẫu được xử lý và mẫu chuẩn, và điều chỉnh theo độ chênh lệch về C_t s đối với gen chuẩn hóa trong các mẫu được xử lý và mẫu chuẩn. Giá trị C_t của gen đích và gen chuẩn hóa lý tưởng là nằm trong khoảng mười lần so với cái còn lại.

Kết quả của việc chạy lượng tử hóa so sánh là biểu đồ đương lượng so sánh. Khi giá trị là 1 cho thấy không có sự thay đổi trong biểu hiện gen đích giữa mẫu đó và mẫu

chuẩn. Bất cứ giá trị nào lớn hơn một chỉ ra là sự điều chỉnh lên và bất cứ giá trị nào nhỏ hơn một chỉ ra sự điều chỉnh xuống. Giá trị được chấp nhận đáng kể nếu được điều chỉnh lên hoặc xuống một lần so với mẫu chuẩn.

Kết quả

Sau 24 giờ ủ, tất cả hợp chất thử nghiệm có thể cảm ứng và kích thích sự biểu hiện LEF1 mARN (Fig. 1). Cũng như vậy WAY316606, được sử dụng làm đối chứng dương cho thấy hoạt tính cảm ứng này.

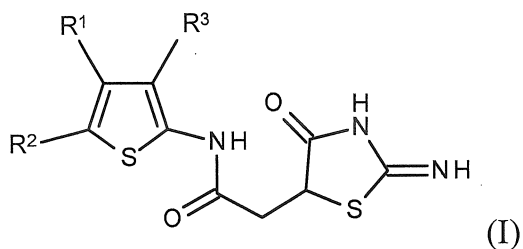
	Lef1	
	cấp số biểu hiện mARN	SEM
Chất dẫn	1	0,668
WAY-316606	2,18	0,097
C1	8,43	0,314
C5	6,05	0,226
C7	2,46	0,559
C17	2,52	0,229
C18	1,56	0,592
C20	1,39	0,621
C21	1,79	0,299
C24	1,88	0,314

Sự cảm ứng chủ yếu của Lef1 thu được bằng hợp chất 1 và 5.

Sau 24h, toàn bộ hợp chất thử nghiệm có thể ức chế sự biểu hiện Lef1 mARN, như được minh họa trong (Fig. 2). Cũng như vậy WAY316606, được sử dụng làm đối chứng dương, đều cho thấy hoạt tính ức chế này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm mỹ phẩm bao gồm hợp chất iminooxothiazolidin có công thức (I):



và

chất mang sinh lý dụng,

trong đó:

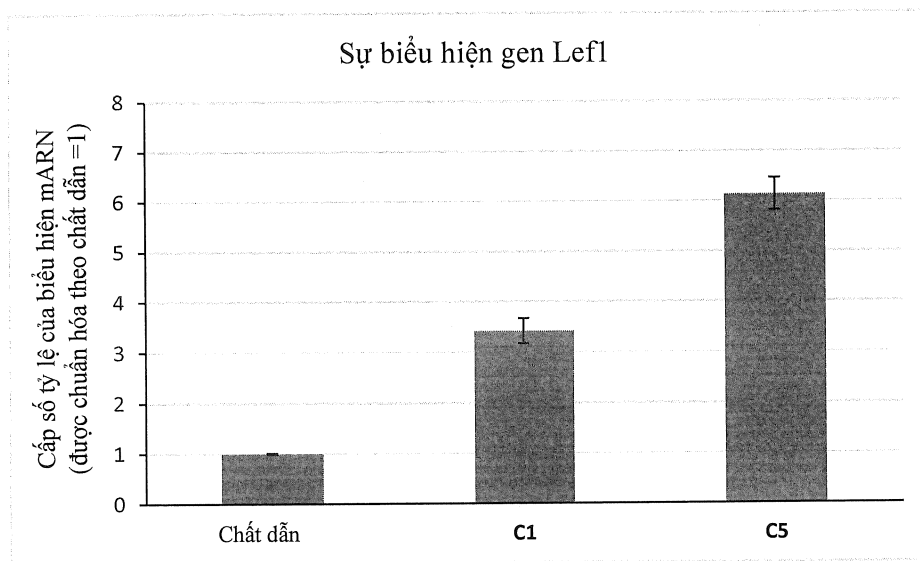
hợp chất iminooxothiazolidin được chọn từ methyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic và ethyl este của axit 2-(2-(2-imino-4-oxo-thiazolidin-5-yl)-axetyl-amino)-4,5-dimetyl-thiophen-3-cacboxylic,

và ở lượng từ 0,001 đến 10% theo khối lượng,

chế phẩm này phù hợp với việc dùng tại chỗ để thúc đẩy sự phát triển của tóc và/hoặc ngăn ngừa và/hoặc giảm sự rụng tóc.

1/2

FIG. 1



2/2

FIG 2

