



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103622961 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201310405099. 9

(56) 对比文件

(22) 申请日 2013. 09. 06

WO 2012024419 A2, 2012. 02. 23,

(73) 专利权人 武汉光谷百桥国际生物科技有限
公司

审查员 魏永燕

地址 430075 湖北省武汉市东湖高新技术开
发区高新大道 858 号 A7 栋

(72) 发明人 杨俊杰 李喆 李雪飞

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 邓寅杰

(51) Int. Cl.

A61K 31/4439(2006. 01)

A61K 31/444(2006. 01)

A61K 31/496(2006. 01)

A61P 17/14(2006. 01)

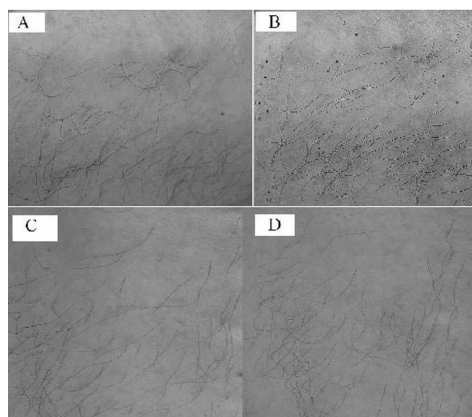
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

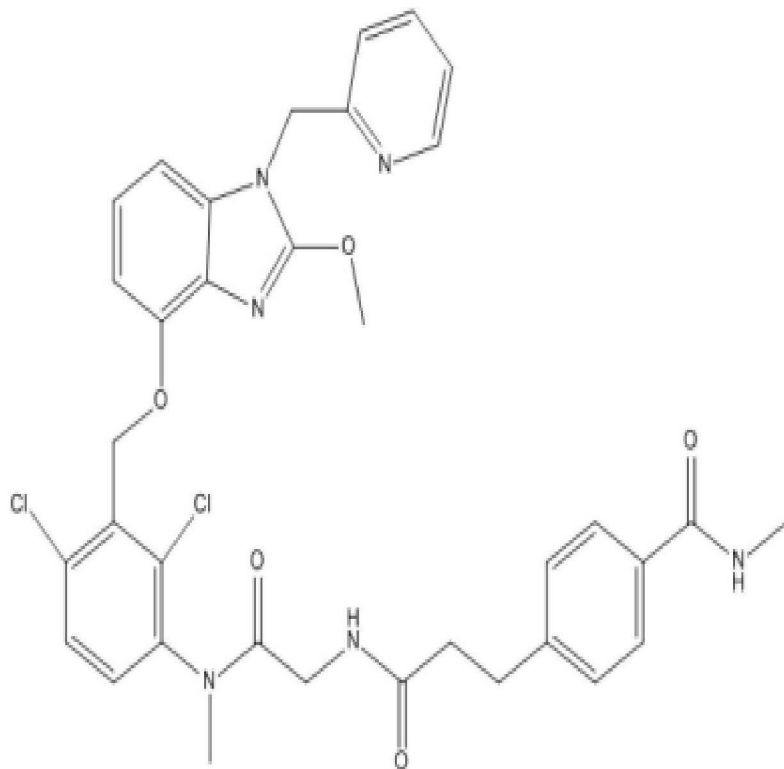
一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在促进毛
发生长方面的应用

(57) 摘要

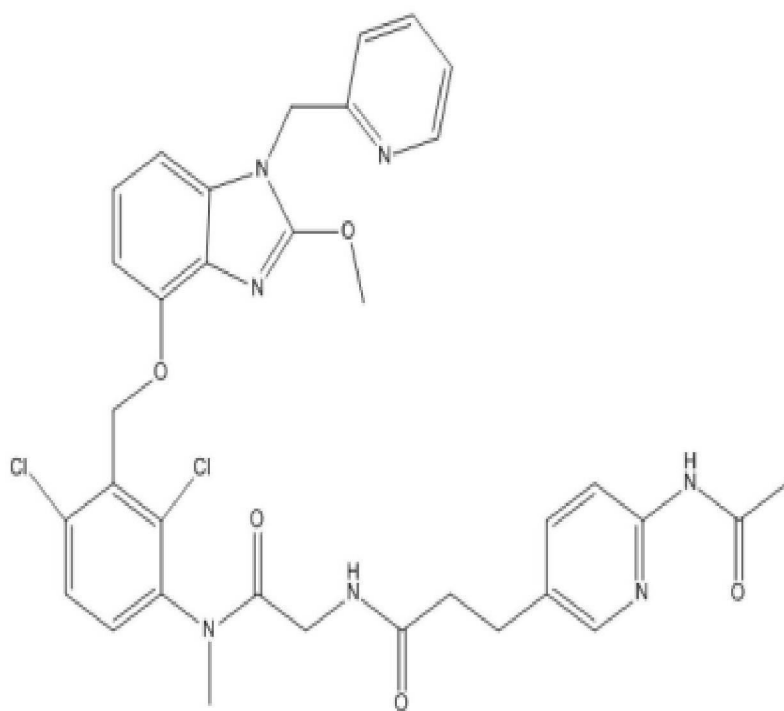
本发明属于医药技术领域, 涉及非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在局部应用促进毛发生长方面的新用途。本发明创造性的发现非肽类缓激肽 B2 受体激动剂具有良好的促进毛发生长的作用, 并通过研究表明其促进毛发生长的作用机理为: 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂能刺激缓激肽 B2 受体引起内源性的前列腺素 F-2a 或前列腺素 E 的释放, 通过前列腺素的受体途径改善局部微环境促进毛发生长, 从而达到促进毛发生长的效果。本发明为治疗各种毛发脱落的新靶点药物的研发提供了新的方向。



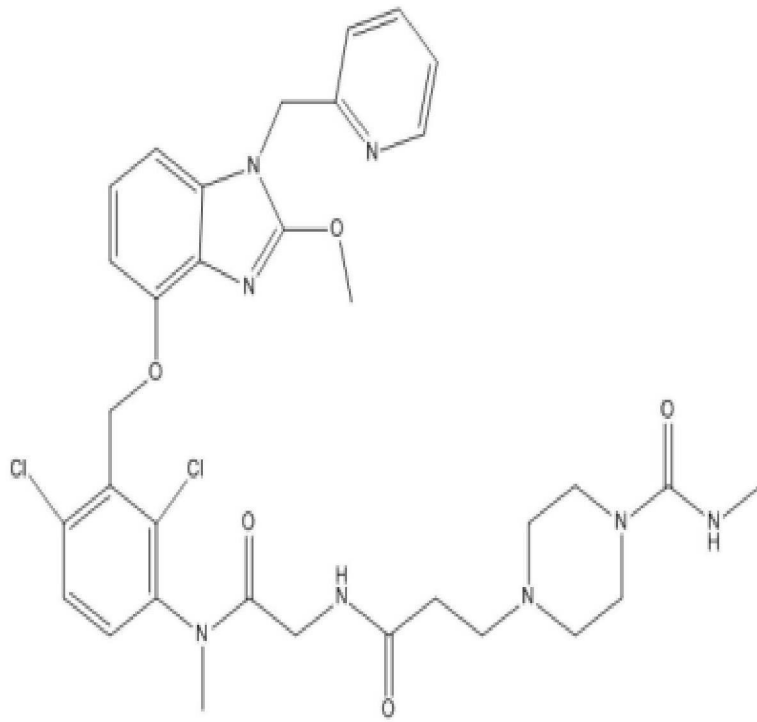
1. 一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在制备治疗促进毛发生长药物中的应用,其中,所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂选自如下化合物:



(YLB-01),



(YLB-02),



(YLB-03)。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述促进毛发生长为治疗毛发脱落。
3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在于,所述毛发脱落为脂溢性脱发、雄性激素脱发、眼睫毛稀少症、或眉毛脱落。

一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在促进毛发生长方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的新用途。

背景技术

[0002] 缓激肽(BK)受体属于 G-蛋白偶联受体(GPCRs),分两个不同的亚型 :B1 和 B2 受体。B2 受体在各种细胞中都有表达,而 B1 受体的在细胞中的表达量很低,只有在组织损伤、炎症和细胞因子作用的情况下表达量才会增加。B2 受体的作用是促进前列腺素的释放,而 B1 受体则介导对前列腺素反应的延迟。当 B2 受体与受体激动剂结合后,能激活磷脂酶使磷脂转换成花生四烯酸,进一步合成前列腺素。

[0003] 前列腺素(prostaglandin, PG)是存在于动物和人体中的一类不饱和脂肪酸组成的具有多种生理作用的活性物质。最早发现存在于人的精液中,当时以为这一物质是由前列腺释放的,因而定名为前列腺素。现已证明精液中的前列腺素主要来自精囊,并且全身许多组织细胞都能产生前列腺素。前列腺素(PG)在体内由花生四烯酸所合成,结构为一个五环和两条侧链构成的 20 碳不饱和脂肪酸。按其结构,前列腺素分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 等类型。不同类型的前列腺素具有不同的功能,如前列腺素 E 能舒张支气管平滑肌,降低通气阻力;而前列腺素 F 的作用则相反。前列腺素的半衰期极短(1~2 分钟),除前列腺素 I2 外,其他的前列腺素经肺和肝迅速降解,故前列腺素不像典型的激素那样,通过循环影响远距离靶组织的活动,而是在局部产生和释放,对产生前列腺素的细胞本身或对邻近细胞的生理活动发挥调节作用。

[0004] 美国宾夕法尼亚大学皮肤病学教授科察雷利斯最近发现,秃发者的头皮上仍有毛囊存在。因此他和同事们推断,要么是毛囊中缺乏令头发生长的催化剂,要么是毛囊活性受到抑制。从受“雄激素性脱发”困扰的男性头皮上取样,测量其中约 2.5 万种不同基因的水平。他们发现,秃发部位的头皮中,一种名为前列腺素 D2 (PGD2)的水平是有头发生长头皮中的三倍。研究人员随即用老鼠和在实验室中培育的毛囊进行验证,并证明 PGD2 蛋白质的确会减少毛发生长。这是一个全新发现,先前“没有人意识到 PGD2 与毛发生长有关”。

[0005] 人们已知,一些前列腺素能促使毛发生长。PGD2 则与其他前列腺素的作用相反,会让毛发越来越短。近年发现,前列腺素 F2a 类似物(抗青光眼的一线药物)如苏为坦(Travotam)有促进眼睫毛生长和瞳孔变黑的功能。从而提示前列腺素亚类有或可能有促进毛发生长的功能。

[0006] 继肥胖、乙肝等传统病症之后,脱发问题也开始成为社会性的话题,中国脱发人群每年都呈现出大量增长的趋势。脱发虽然不是病,但严重影响了人的外形,并会给人带来巨大的心理压力。2011 年 11 月,据中国健康促进与教育协会公布的“中国脱发人群调查”数据表明,我国脱发人群约达 2 亿,其中男性脱发人数约 1.3 亿。所有脱发人群中,31 岁至 40 岁之间脱发的人群占 48.33%,20 至 30 岁脱发的人群占 23.14%,而 20 岁之前开始脱发的人占了 6.31%。相比于四年前的调查数据显示:近年来脱发人群出现低龄化,并且 30 岁至 40

岁的脱发人数相较于四年前以 14% 的速度递增。

[0007] 脱发基本分为脂溢性脱发、神经性脱发、疤痕性脱发、疾病性脱发、雄激素性脱发 (Androgenetic Alopecia, AGA) 也称男性型脱发,这五大类。但其中脂溢性脱发占 90% 以上,是最常见的脱发方式。

[0008] 关于脱发治疗,因为受到对发病机理认识的局限,目前只有两种药物被广泛证实安全有效。目前国内外抗脱发西药治疗的药物有:一种是口服药 1mg 非那雄胺;另一种是外用的 1~5% 米诺地尔制剂,男女均可用。两者共用效果可能更好,但每月费用相应就会升高;两者都有明显的副作用如性功能障碍和女性怀孕后胎儿的泌尿外生殖器系统发育异常等。

发明内容

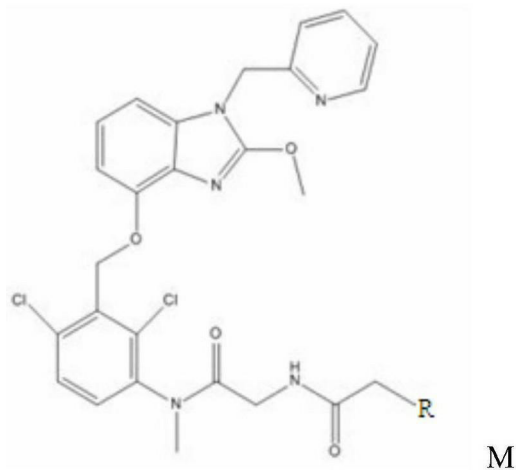
[0009] 本发明提供了一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在促进毛发生长方面的新用途。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0011] 一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在促进毛发生长方面的应用。

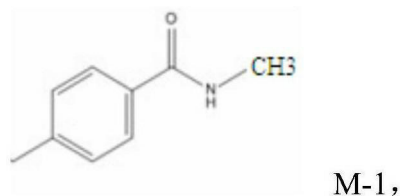
[0012] 上述方案中,所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂是一种通式 M 的化合物及其药学可接受的盐类,溶剂合物和它们的任何的立体化学异构体,和这样的盐的溶剂合物

[0013]

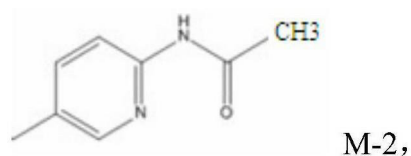


[0014] 其中 R 选自以下基团:

[0015]

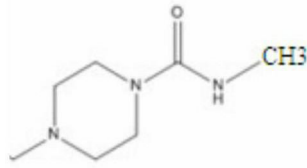


[0016]



[0017] 和

[0018]



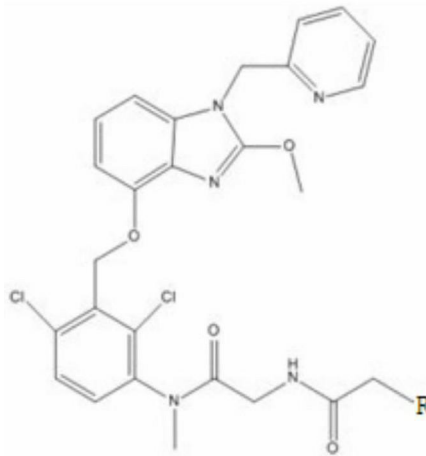
M-3。

[0019] 上述方案中,所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在促进毛发生长方面的应用为非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在治疗毛发脱落方面的应用;其中所述毛发脱落为脂溢性脱发、雄性激素脱发、眼睫毛稀少症、或眉毛脱落。

[0020] 一种促进毛发生长的药物制剂,是以非肽类缓激肽 B2 受体激动剂为活性成分,加上药学上可接受的辅料或辅助性成分制备而成。

[0021] 上述方案中,所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂是一种通式 M 的化合物及其药学可接受的盐类,溶剂合物和它们的任何的立体化学异构体,和这样的盐的溶剂合物

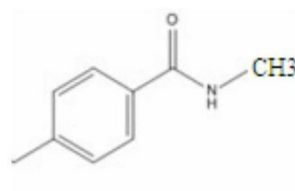
[0022]



M

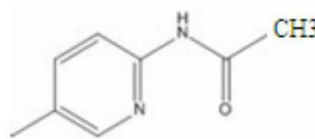
[0023] 其中 R 选自以下基团:

[0024]



M-1,

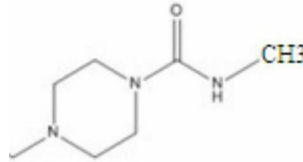
[0025]



M-2,

[0026] 和

[0027]



M-3。

[0028] 上述方案中,所述药物制剂为外用制剂。

[0029] 本发明中,用于促进毛发生长的外用制剂的制备及使用方法:

[0030] 取非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 50 ~ 2000mg 溶解在 100ml 溶剂中,适合的溶剂为水、生理盐水、磷酸缓冲液(PBS)、乙醇、二甲亚砜、乙二醇单乙醚、二乙二醇单丁醚、及二甲基甲酰胺中的一种或几种,优选的溶剂为乙醇;同时还可添加一定浓度(0.001 ~ 0.1%)的香精。常规外用制剂的配比见下表 1,2;对酒精过敏的脱发患者可使用如下表 3 所示制剂。外用制剂的使用方法为:每天两次,每次以覆盖脱发部位为宜。

[0031] 表 1 常规外用制剂

[0032]

成分	用量
非肽类缓激肽 B2 受体激动剂	50 ~ 2000mg
95% 酒精	100ml

[0033] 表 2 常规外用制剂

[0034]

成分	用量
非肽类缓激肽 B2 受体激动剂	50 ~ 2000mg
95% 酒精	50ml
磷酸缓冲液	50ml

[0035] 表 3 可用于酒精过敏的脱发患者的外用制剂

[0036]

成分	用量
非肽类缓激肽 B2 受体激动剂	50 ~ 2000mg
二甲亚砜(溶解药物)	10ml
磷酸缓冲液	90ml

[0037] 本发明创造性的发现一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂具有良好的促进毛发生长的作用,并通过研究表明其促进毛发生长的作用机理为:用缓激肽 B2 受体激动剂可以刺激缓激肽 B2 受体引起内源性的前列腺素 F-2a 和前列腺素 E 的释放,通过前列腺素的受体途径改善局部微环境,从而达到促进毛发生长的效果。本发明的非肽类缓激肽 B2 受体激动剂

制剂是一种新结构、新靶点、新机制的毛发生长创新药物。

[0038] 本发明的有益效果：

[0039] (1) 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂可以刺激缓激肽 B2 受体引起内源性的前列腺素 F-2a 和前列腺素 E 的释放,通过改变局部微环境中前列腺素含量及其亚类的比例,实现促进毛发生长的效果,为治疗脱发的药物生产提供了新的方向。

[0040] (2) 本发明为治疗脱发新药物的研发提供了可靠的理论依据,采用药物外用制剂,可直接局部外用,在局部发挥作用,减少全身用药的副作用。

附图说明

[0041] 图 1 为脱发患者的治疗效果图,其中 A 为使用前, B 为使用药剂(YLB-01)一个月后;C 为使用前, D 为使用 95% 的酒精一个月后的对照图;

[0042] 图 2 为促进毛发增长的效果图,其中 A 为使用 95% 的酒精 2 周后的对照, D 为使用药剂(YLB-01)2 周后的效果图;B 为使用 95% 的酒精 3 周后的对照, E 为使用药剂(YLB-01)3 周后的效果图;C 为使用 95% 的酒精 4 周后的对照, F 为使用药剂(YLB-01)4 周后的效果图;

[0043] 图 3 为三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的药效功能团结构,其中 A 为 YLB-01, B 为 YLB-02, C 为 YLB-03;

[0044] 图 4 为三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂与主要的残基的相互作用,其中 A 为 YLB-01, B 为 YLB-02, C 为 YLB-03;

[0045] 图 5 为三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂在配体结合位点的部分条带结构图,其中 A 为 YLB-01, B 为 YLB-02, C 为 YLB-03;

[0046] 图 6 为非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-01 的 PFSC 结合位点;

[0047] 图 7 为非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-02 的 PFSC 结合位点;

[0048] 图 8 为非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-03 的 PFSC 结合位点。

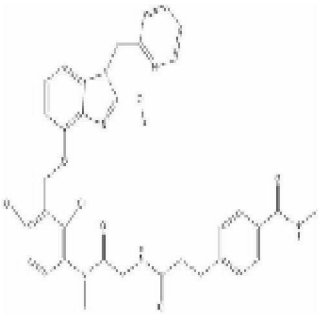
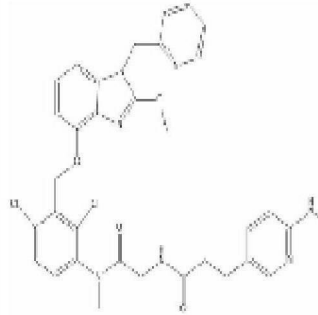
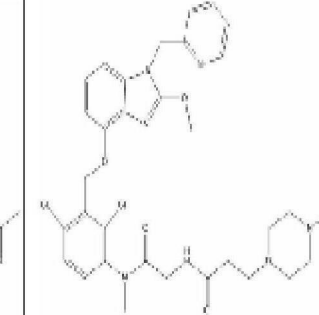
具体实施方式

[0049] 为了更好的理解本发明的实质,下面结合附图、附表和实施例来进一步说明本发明所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂对促进毛发生长的作用机理和效果,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0050] 以下实施例中,所述非肽类缓激肽 B2 受体激动剂为表 4 所示的三种化合物,其中 YLB-01 是通式 M 中 R 基团为 M-1 的化合物,其英文名是:4-(3-2-((2,4-dichloro-3-(2-methoxy-1-(pyridine-2-ylmethyl)-1H-benzo[d]imidazol-4-yl)oxy)methyl)phenyl)(methyl)amino-2-oxoethylamino)-3-oxopropyl)-N-methylbenzamid;YLB-02 是通式 M 中 R 基团为 M-2 的化合物,其英文名称为:3-(6-acetamidopyridin-3-yl)-N-(2-((2,4-dichloro-3-(2-methoxy-1-(pyridine-2-ylmethyl)-1H-benzo[d]imidazol-4-yl)oxy)methyl)phenyl)(methyl)amino-2-oxoethyl)propanamide;YLB-03 是通式 M 中 R 基团为 M-3 的化合物,其英文名称为:4-{2-[(2,4-Dichloro-3-(2-methoxy-1-pyridin-2-ylmethyl)-1H-benzoimidazol-4-yl)oxymethyl]-phenyl}-methyl-carbamoyl}-methyl-carbamoyl]-ethyl}-piperazine-1-carboxylic acid methylamide。

[0051] 表 4 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂

[0052]

名称	YLB-01	YLB-02	YLB-03
结构式			
分子式	$C_{35} H_{34} Cl_2 N_6 O_5$	$C_{34} H_{33} Cl_2 N_7 O_5$	$C_{33} H_{38} Cl_2 N_8 O_5$
分子量	689.60	690.59	697.62

[0053] 实施例 1

[0054] 一、缓激肽 B2 受体激动剂激发缓激肽 B2 受体分泌前列腺素 (Prostaglandin, PG) 的实验

[0055] 选用表 4 所示三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂进行实验,以缓激肽(BK)作为对照组,具体操作步骤为:首先接种细胞株到 T-75 培养瓶中生长,细胞长满后,严格按照 PG 试剂盒的说明操作:第 1 天,将细胞接种至 24 孔板中生长过夜,其培养基为基础培养基;第 2 天,用无血清培养基饥饿细胞;第 3 天,将无血清培养基切换到基础培养基,向 27 组基础培养基中加入上述三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂,每组基础培养基中添加一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂,每种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的添加剂量分别为 0.1nM, 1nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M 和 10 μ M,于此同时在另一组基础培养基中添加 1 μ M 缓激肽作为对照组,将细胞于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时,培养结束后,收集细胞上清液,备用;

[0056] 第四天,洗涤培养板和显色(45 ~ 90min),然后测量 OD 值进行定量分析,得到 B2 受体激动剂的 OD (420nm) 读数从而计算出 EC_{50} , E_{MAX} 。计算结果见表 5。

[0057] 上述实验中所用细胞株为人主动脉平滑肌细胞(Human aortic smooth muscle cells, HASMC)。

[0058] 表 5 缓激肽 B2 受体激动剂的 EC_{50} 和 E_{max}

[0059]	药物/ 细胞	HASM C		
		EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	n
	缓激肽 (BK)	7.4 ± 1.4	100.6 ± 5.5	10
	YLB-01	24.4 ± 3	87.79 ± 4.2	16
	YLB-02	40.65 ± 4.19	70.44 ± 5.06	13
	YLB-03	26.23 ± 2.87	103.48 ± 9.06	12

[0060] 表 5 的结果说明, 缓激肽(BK) 的 EC₅₀ 浓度最低, YLB-02 的 EC₅₀ 浓度最高, 且 E_{max} 仅为缓激肽(BK) 的 70%。YLB-01 和 YLB-03 的 E_{max} 分别为缓激肽(BK) 的 87% 和 103%, 但是 EC₅₀ 的浓度是 BK 的三倍多。

[0061] 二、内源性前列腺素的测定

[0062] 采用基于细胞竞争的酶联免疫(EIA, Enzyme immunoassay) 法, 测定上述

[0063] 细胞上清液中的 PG 及其亚类的量, 整个 EIA 测定反应需要 18 小时, 结果见下表 6。

[0064] 表 6 PG 分泌量百分比(%)

[0065] 以 1 μM 缓激肽刺激释放获得的 PG 分泌量为基准(100%)

[0066]	药物	添加量		
		YLB-01	YLB-02	YLB-03
	10μM	86.48±7.44	65.53±5.78	103.48±9.06
	3μM	87.79±4.2	70.44±5.06	95.59±7.21
	1μM	86.98±3.76	66.94±8.11	85.04±4.83
	300nM	83.83±6.45	67.35±7.02	86.23±8.51
	100nM	73.43±2.7	65.64±8.10	70.95±4.57
	30nM	53.71±4.56	41.08±6.97	55.68±4.09
	10nM	46.13±3.11	26.40±6.06	47.33±4.22
	1nM	7.69±2.19	15.21±3.36	10.31±2.30
	0.1nM	0.00±1.54	0±1.32	0.44±1.22

[0067] 表 6 的结果说明: 以 1 μM 缓激肽(BK) 刺激释放获得的 PG 分泌量为基准(100%), 对添加不同浓度的药物 YLB-01, YLB-2 和 YLB-03 刺激释放的 PG 的量进行了比较。结果表明 YLB-01 和 YLB-03 的效果较好, 3 μM 的 YLB-01 刺激分泌的 PG 的量相当于 1 μM 缓激肽(BK) 刺激释放的 PG 的量的 87.79%, 10 μM 的 YLB-03 刺激分泌的 PG 的量相当于 1 μM 缓激肽(BK) 刺激释放的 PG 的量的 103.48%, 而 YLB-02 的效果略差, 3 μM 的 YLB-02 刺激分泌的 PG 的量相当于 1 μM 缓激肽(BK) 刺激释放的 PG 的量的 70.44%。

[0068] 三、缓激肽 B2 受体抑制剂 HOE-140 阻断前列腺素分泌的实验

[0069] 具体的实验步骤: 首先接种两种细胞系到 T-75 培养瓶中生长, 细胞长满后, 严格按照 PG 试剂盒的说明操作: 第 1 天, 将细胞接种至 24 孔板中生长过夜, 其培养基为基础培养基; 第 2 天, 用无血清培养基饥饿细胞; 第 3 天, 将无血清细胞培养基切换到基础培养基, 向 27 组基础培养基中加入上述三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂, 每组基础培养基中添加一种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂, 每种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的添加剂量分别为

0.1nM, 1nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M 和 10 μ M, 同时加入 1 μ M HOE-140, 其中在另一组基础培养基中只添加 1 μ M 缓激肽作为对照组, 将细胞于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时, 培养结束后, 收集细胞上清液, 备用; 最后在第四天, 洗涤培养板和显色 (45-90min), 然后进行定量分析, 得到 B2 受体激动剂的 OD (420nm) 读数从而计算出 EC50, EMAX。

[0070] 上述细胞上清液中 PG 的测定方法同上, 定量实验结果见表 7。表 7 的结果表明 1 μ M HOE-140 可阻断本发明所述的缓激肽 B2 受体激动剂的促前列腺素释放功能。因 HOE-140 是 B2 受体的阻断剂, 因此可以说明此缓激肽 B2 受体激动剂是通过 B2 受体发挥前列腺素释放功能的。

[0071] 表 7 PG 分泌量 (%)

[0072] 以 1 μ M 缓激肽刺激释放获得的 PG 分泌量为基准 (100%)

添加量 \ 药物	YLB-01+HOE-140	YLB-02+HOE-140	YLB-03+HOE-140
	1 μ M	1 μ M	1 μ M
1 μ M	40.32 \pm 3.27	10.1 \pm 4.43	26.08 \pm 7.56
3 μ M	6.98 \pm 1.6	4.25 \pm 2.06	7.33 \pm 4.12
[0073] 10 μ M	3.66 \pm 2.11	2.87 \pm 3.04	5.14 \pm 2.67
0.1nM	1.54 \pm 2.53	3.65 \pm 2.77	0.54 \pm 3.59
1 nM	4.21 \pm 3.74	0.21 \pm 4.42	2.65 \pm 3.81
10 nM	4.17 \pm 3.21	5.60 \pm 3.43	5.64 \pm 4.05
30 nM	2.86 \pm 2.35	3.33 \pm 1.88	4.90 \pm 4.83
100nM	3.44 \pm 3.77	0.43 \pm 4.16	3.97 \pm 2.75
300nM	0.45 \pm 2.86	1.05 \pm 2.39	0.48 \pm 3.50

[0074] 实施例 2

[0075] 一、非肽类缓激肽 B2 受体激动剂激发 B2 受体释放的前列腺素亚类分析

[0076] 利用上述三种非肽类缓激肽 B2 受体激动剂诱导人原代动脉内皮细胞和人主动脉平滑肌细胞释放前列腺素, 具体操作步骤同实施例 1。采用 EIA 测定法测定 PG 亚类含量, 测定方法同实施例 1, 结果见表 8。结果表明, 缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-01 能促进细胞株 HASMC 和 HPVEC 释放前列腺素 F-2a 和前列腺素 E, 其中前列腺素 E 的含量是前列腺素 F-2a 的 5~6 倍, 而前列腺素 D 未检出; 缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-02 和 YLB-03 能促进细胞株 HASMC 释放前列腺素 F-2a 和前列腺素 E, 而前列腺素 D 未检出; 但是缓激肽 B2 受体激动剂 YLB-02 和 YLB-03 只能促进细胞株 HPVEC 释放前列腺素 E, 而前列腺素 F-2a 和前列腺素 D 均未检出, 没检出的原因可能是和它的含量太低有关, 也可能和试剂盒的敏感度有关。HOE-140 B2 受体阻滞剂能阻止缓激肽 B2 受体激动剂对 B2 受体的前列腺素释放的功能。因缓激肽 (BK) 不能穿透皮肤, 且有明显的毒副作用, 还不能成为一个药物在临床上应用, 而上述结果表明, 此缓激肽 B2 受体激动剂可替代缓激肽 (BK), 实现诱导 B2 受体释放内源性前列腺素 E2 和前列腺素 F-2a 的功能。

[0077] 表 8 前列腺素亚类分泌量百分比 (%)

[0078] 以 $1 \mu\text{M}$ 缓激肽 (BK) 刺激释放获得的 PG 亚类分泌量为基准 (100%)

药物	细胞株	PGE2 (%)	PGF-2a (%)	PGD2(%)
YLB-01	HASMC	34.64 ± 12.27	5.68 ± 2.08	未检测出
	HPVEC	30.24 ± 5.40	6.29 ± 1.01	未检测出
YLB-02	HASMC	26.33 ± 6.78	7.1 ± 3.41	未检测出
	HPVEC	34.15 ± 9.54	未检测出	未检测出
YLB-03	HASMC	27.83 ± 10.66	8.43 ± 3.57	未检测出
	HPVEC	31.04 ± 8.49	未检测出	未检测出

[0080] HPVEC :人原代静脉内皮细胞 ;HASMC :人主动脉平滑肌细胞

[0081] 实施例 3

[0082] 按照非肽类缓激肽 B2 受体激动剂体外细胞实验的浓度,取非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 (YLB-01) 100mg,溶解到 100ml 的 95% 的酒精中,配置成药物制剂质量体积浓度为 0.1% 的外用制剂,对中青年的早期脂溢性脱发和雄性激素性脱发进行喷涂,每天两次,每次以覆盖脱发部位为宜,同时以 95% 酒精为对照组,进行同样的喷涂。每天观察头发的生长状况及有无明显的副作用,如红肿、瘙痒、疼痛等,每周照相记录头发的生长状况,结果见图 1,从结果可看出治疗后,肉眼可见细小的毛发从以前未长头发的地方长出(红色标记处),约有 12 个新的毛发长出,而对照组无新的毛发长出。为比较 YLB-01 促进毛发的生长速度,剃去左右腿的毛发,用同上的方式喷涂,然后每周测量毛发的长度,从第二周开始在随机挑选 20 根毛发的长度比较中,YLB-01 组的毛发长度与对照相比明显延长,如图 2、表 9 所示。

[0083] 表 9. 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 (YLB-01) 对毛发增长的影响 (mm)

[0084]

	0 周	2 周	3 周	4 周
对照组	0	4.6 ± 0.57	6.22 ± 0.65	8.92 ± 0.94
YLB-01	0	4.89 ± 0.38	6.82 ± 0.4	9.61 ± 0.55

[0085] 注 :与对照相比毛发增长明显,两周 ($p < 0.05$),三周 ($p < 0.001$) 和四周 ($p < 0.01$)

[0086] 实施例 4

[0087] 利用同源建模技术建立非肽类缓激肽 B2 受体激动剂体与 B2 受体结合模型。AT1R 和 B2R 都属于 7TM 或 G 蛋白偶联受体 (GPCRs),他们序列有 30% 相似性,并且都易于在跨膜部位的相似结合处结合小分子配体。因此,我们希望研究缓激肽 B2 受体激动剂体与 B2R 之间的相互作用。然而利用计算机在分子水平研究配体-GPCR 复合物结构,目前只有两种 GPCR 射晶体结构可以应用:基态视紫红质结构和 $\beta 2$ - 肾上腺素能受体 ($\beta 2$ -ADR)。缓激肽受体 B1 和 B2 属于视紫红质类 GPCR (G 蛋白偶联受体) 的 A 类家族。

[0088] 同源建模:在缺少 B2R 结构的情况下,通过使用同源建模的技术,将牛的视紫红质 (PDBID:1HZX) 的高分辨率捷径结构用来做模板。我们从 Swiss-Prot 数据库获得 B2 受体序列 (进入 P30411) 数据。应用 Discovery Studio 3.5 软件包的 MACROMOLECULES,建立一个

初始的 3D 同源模型。我们再使用 CHARMM 力场进行 MD 模拟。通过 The Ramachandran Plot 和 Verify Protein (Profiles-3D) 协议对模型结构进一步评估。

[0089] 配体制备 :通过 Chemdraw3.0 并应用 CHARMM 力场获得获得非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的结构。

[0090] 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 -B2R 偶联配体模型建立 :该受体结构具有 A 类 GPCR 家族同源性。受体的 Input Site Sphere 输入分别位于 -0.164482, 6.6825, 22.61, 22.4, 我们应用一款强大的基于 CHARMM 对接方法的 CDOCKER 软件生成高准确度的靶点对接区, 把一个随机构造血管紧张素受体拮抗剂嵌入 B2 受体的结合位点。Input site sphere 的受体口袋分别位于 -0.1644826.6825, 22.61, 22.4。我们推出的 CDOCKER 是一个功能强大的 CHARMM 基于对接的方法可生成高度精确的对接的姿势。将非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的随机构型对接到 BK 受体结合位点,

[0091] 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂的药效功能团结构见图 3, 药效功能包括疏水性、芳烃、氢键受体、氢键给体的负离子化。由于氢键是有方向性的, 每个 HBA (在形成氢键时, 接受氢原子的这方面是 HBA, 通常是带有部分负电荷的 O 或者 N 原子) 特性具有两个特点 :一个是相关联的重原子的位置, 而另一个是投射点, 即与目标结合形成氢键的方向, 每个球体定义一个特定的位点的位置容忍度。

[0092] 非肽类缓激肽 B2 受体激动剂主要的残基的相互作用见图 4。

[0093] 进一步研究 B2 受体激动剂在配体结合位点的部分条带结构, 结构见图 5, 由图可以推断 B2 受体激动剂可以于 N- 断口袋, H4-H5 口袋, H6-H7 口袋及 TM7 与配体结合。

[0094] 同时, 我们使用 PFSC 的代码来描述的三维蛋白结合位点, 结果示于图 6。图 6 为非肽类缓激肽 B2 受体激动剂 (YLB-01, YLB-02, YLB-03) 的 PFSC 结合位点, 数目代表链上的结合点。氨基酸参与形成 H- 键和 PI 相互作用显示于框内。几何 :氨基酸的属性说明, tiny=T, small=S, large=L, hardness=H;Phy-Chem:Chemical-Physical Properties, hydrophobicity=P, acidic=A, basic=B, the Glycine=H, OH=O, carbonyl and amide group O=CNH2=N, SH=S。PFSC 代码 :PFSC 结构分配方法, “A” 表示 α -螺旋和 “B” β -链。

[0095] 下表 10 和表 11 为 B2 受体激动剂的药效特性的数目和参与相互作用的残基。

[0096] 表 10B2 受体激动剂的药效特性的数目

[0097]

药物	负离子基团	芳香基团	氢键接受体	氢键供体	疏水基团
YLB-01	0	3	2	0	1
YLB-02	0	3	2	1	1
YLB-03	0	3	0	0	1

[0098] 表 11 参与相互作用的残基

[0099]

	氢键接受体	氢键供体	PI 相互作用

YLB-01	G205, I219, Y322	E204, T314, Y322	W5, R297
YLB-02	ARG338, TYR332	GLU93	ARG167
YLB-03	VAL91, GLN352, ARG338	0	TYR347

[0100] 综上所述,此模型显示了 B2 受体激动剂和受体之间的结合位点数目,表明 YLB-01 的结合力较强,而 YLB-02, YLB-03 相对较弱,但是从诱导 PG 及其亚类的释放的效果来看,释放的强弱与结合力强弱没有明显的相关性。换句话说讲,即在一定的结合力的基础上,诱导 PG 释放的功能大致相当。此方法为新药研发或老药新用的开发提供了方便快速的筛选的方法,我们正是通过此项技术的应用发现了几个老药新的用途。

[0101] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的实例,而并非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而因此所引申的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

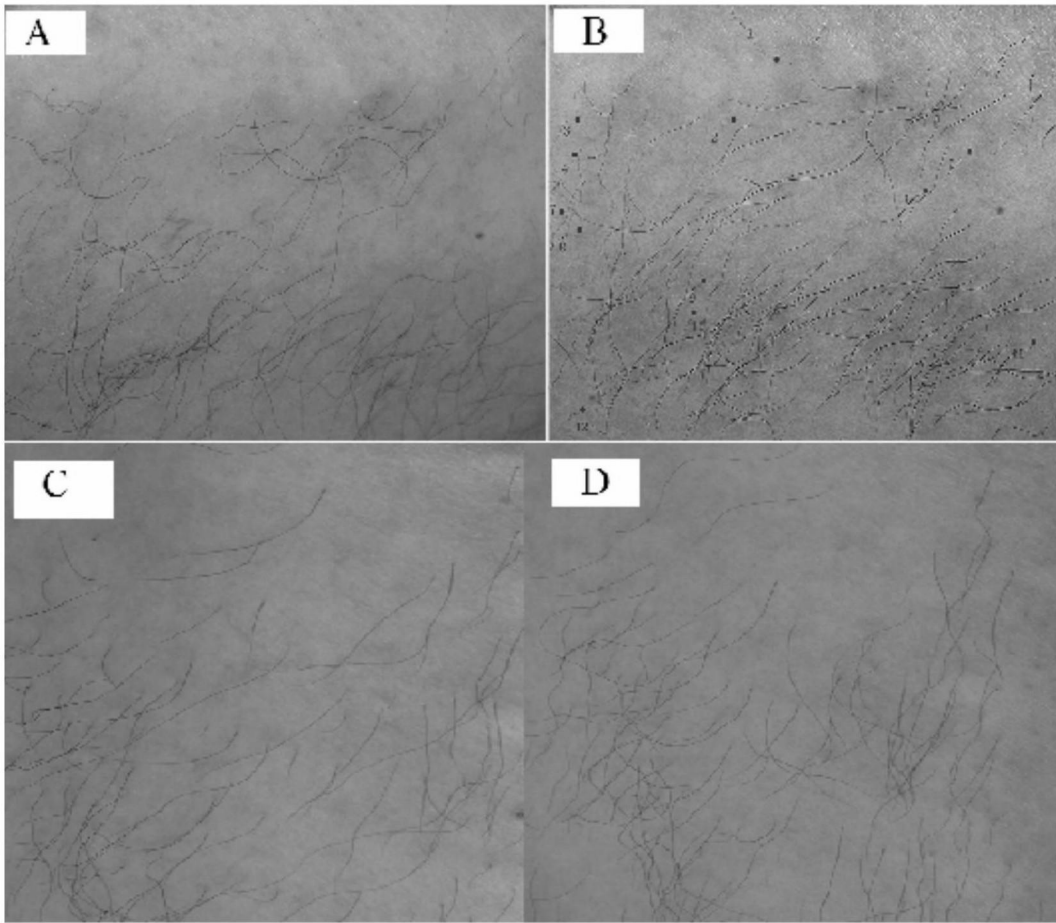


图 1

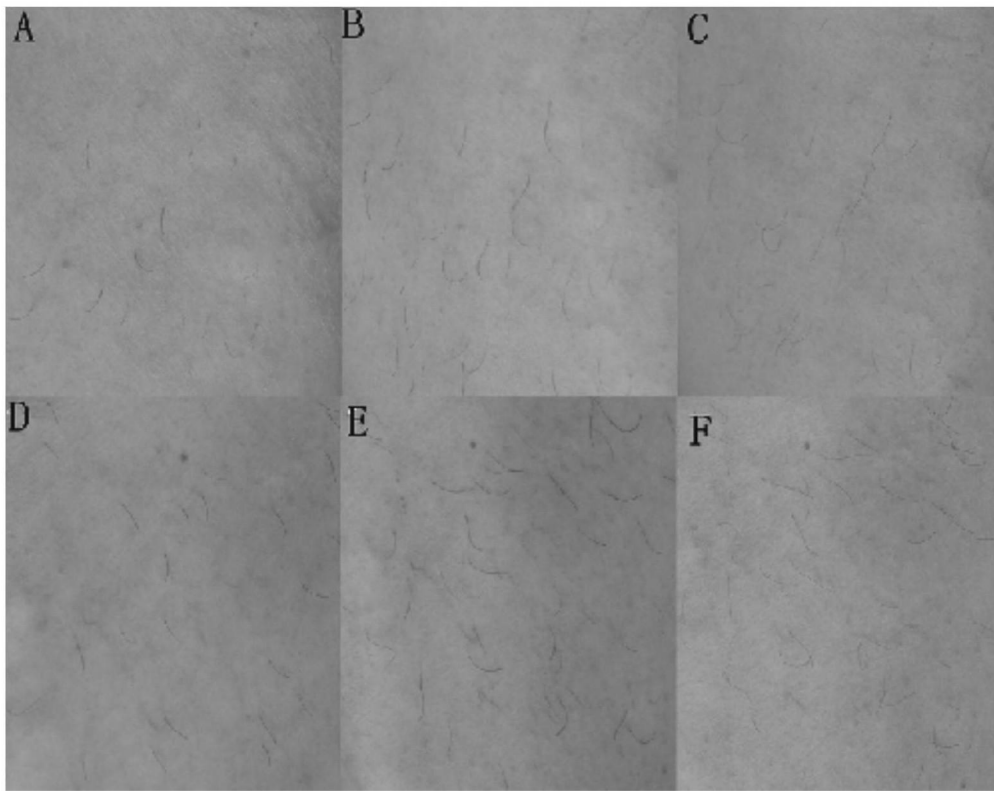


图 2

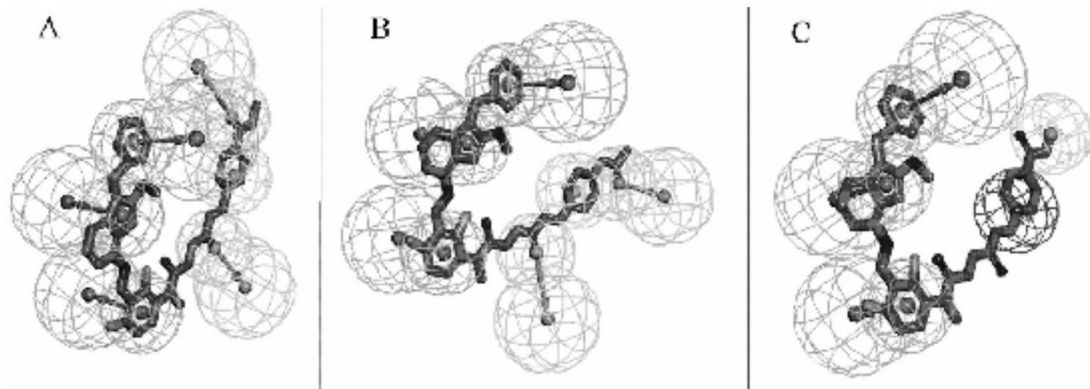


图 3



图 4



图 5

	78-96	147-165	331-340
Geometry:	SLTSLSLLLTTSSSTLLLL	LLLSTLSLLTSLSLTL	SLSLSTILL
PhysicoChemical:	PPOPPSPBBOOSOPPAPOP	PPPPPOPABOPPPBPOP	POPPPHBBPB
AA Sequence:	VLSVFCLHKSSCTVAEIIYL	FLMLVSDRYLALVKTMSM	VYVIVGKRFR
PFSC Code:	ADDADDAJVAAJWZAAAA	AAAAADAAADDDJBVPYJ	DDDDAJVAAA

图 6

	74-96	261-271	329-353
Geometry:	LSLLSLTSLSLLLTTSSSTLLLL	LLLSELLTSSL	HLSLSLSTLLLLLLLTLSSLL
PhysicoChemical:	ANPPPOPPSPBBOOSOPPAPOP	APNOABBPOPP	PPPOPPHBBPBBBOPAPONHPSNB
AA Sequence:	ENIFVLSVFCLHKSSCTVAEIIYL	EIQTERRATVL	PLVYVIVGKRFRKKSWEVYQGVCK
PFSC Code:	DDAAADDADDAJVAAJWZAAAA	ZAAADAAAAAD	AADDDAJVAAPCSVQCSWSBWE

图 7

	74-96	261-271	329-353
Geometry:	LSLLSLTSLSLLLTTSSSTLLLL	LLLSELLTSSL	HLSLSLSTLLLLLLLTLSSLL
PhysicoChemical:	ANPPPOPPSPBBOOSOPPAPOP	APNOABBPOPP	PPPOPPHBBPBBBOPAPONHPSNB
AA Sequence:	ENIFVLSVFCLHKSSCTVAEIIYL	EIQTERRATVL	PLVYVIVGKRFRKKSWEVYQGVCK
PFSC Code:	DDAAADDADDAJVAAJWZAAAA	ZAAADAAAAAD	AADDDAJVAAPCSVQCSWSBWE

图 8