(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 697 24 861 T2** 2004.07.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 797 978 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 24 861.5**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 105 023.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **25.03.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.10.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 7/06**

(30) Unionspriorität:
**7590396 29.03.1996 JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
**Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP**

(74) Vertreter:
**Vossius & Partner, 81675 München**

(72) Erfinder:
**Takahashi, Tomoya, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-11, JP; Yokoo, Yoshiharu, Ushiku-shi, Ibaraki 300-12, JP; Kamiya, Toshikazu, Machida-shi, Tokyo 194, JP; Shirai, Akio, Machida-shi-shi, Tokyo 194, JP; Tamaoki, Tatsuya, Machida-shi, Tokyo 194, JP**

(54) Bezeichnung: **Haarwuchsmittel enthaltend einen spezifischen Hemmer der Protein-Kinase C**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Sachgebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Haarwuchsmittel, das bestimmte Proteinkinase C-spezifische Inhibitoren umfaßt, und die Anwendung dieser Inhibitoren zur Herstellung eines Haarwuchsmittels.

### Hintergrund der Erfindung

[0002] Es ist offenbart worden, daß Substanzen mit einer Proteinkinase-inhibierenden Wirkung, nämlich 3-Amino/Hydroxy-4-[4-Benzoyl-Phenylcarbonylamino/Oxy]Azepane das Haarwachstum stimulieren (vgl. EP 663393 A1); doch diese Proteinkinase-Inhibitoren haben neben der inhibierenden Wirkung auf Proteinkinase C (hier nachstehend als PKC bezeichnet) auch eine inhibierende Wirkung auf Proteinkinase A (hier nachstehend als PKA bezeichnet).

[0003] Es ist bekannt, daß in Haarfollikelorgan-Kultursystemen ein PKC-Inhibitor, nämlich H-7 [1-(5-Isochinolinylsulfonyl)-2-Methylpiperazin] die haarwachstumsverzögernde Wirkung einer PKC-aktivierenden Substanz, und zwar 12-0-Tetragalloyl-Phorbol-13-Acetat auslöst (vgl. British Journal of Dermatology, 133, 5, 686–693, 1995). Es ist ferner bekannt, daß das erwähnte H-7 neben einer PKC-inhibierenden Wirkung eine PKA-inhibierende Wirkung aufweist (vgl. Bio/Technology, 8, 732, 1990).

[0004] In Haarfollikelorgan-Kultursystemen setzt der PKC-Inhibitor H-7 die haarwachstumshemmende Wirkung von 12-0-Tetragalloyl-Phorbol-13-Acetat frei, doch war dieser PKC-Inhibitor bisher nicht für eine haarwuchsfördernde Wirkung bekannt (vgl. British Journal of Dermatology, 133, 5, 686–693, 1995).

[0005] Von Proteinkinase-Inhibitoren, die sowohl eine PKC-inhibierende als auch eine PKAinhibierende Wirkung haben, konnte nicht immer erwartet werden, daß sie zufriedenstellende haarwachstumsfördernde Ergebnisse liefern. Von H-7 und den 3-Amino/Hydroxy-4-[4-Benzoyl-Phenylcarbonylamino/Oxy]Azepanen konnte nicht immer erwartet werden, daß sie zufriedenstellende haarwachstumsfördernde Ergebnisse liefern, da solche Verbindungen sowohl eine PKC-inhibierende als auch eine PKA-inhibierende Wirkung haben.

[0006] Ein Artikel von C. S. Harmon, T. D. Nevins et al.: „Bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitors are potent stimulators of DNA synthesis in mouse hair follicle organ cultures", in J. Invest. Dermatol., Bd. 104, Nr. 4, (April 1995), Seite 606 XP002035589, offenbart, daß bestimmte (vier) Bisindolylmaleimide (Ro. 31-7549, Ro ... usw.) im Vergleich zur PKA-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase 50- bis 1000mal stärkere Inhibitoren des zellfreien PKC sind. Es zeigte sich, daß diese vier Verbindungen Stimulatoren der Mäuse-Haarfollikel-DNA-Synthese sind, und es wird postuliert, daß sie Stimulatoren des Haarwachstums bei der Behandlung von androgener Alopezie sind.

[0007] In einem Artikel der gleichen Autoren, C. S. Harmon, T. D. Nevins et al.: „Protein kinase C inhibits human hair follicle growth and hair fibre production in organ culture", in British Journ. of Dermatology, Bd. 133, Nr. 5 (November 1995), Seiten 686–693, der ungefähr sieben Monate später veröffentlicht wurde, nehmen die Autoren ihre Aussage zurück, da sie zum Schluß kamen, daß

(i) die Verbindung Ro. 31-7549 für PKC selektiv, jedoch kein spezifischer Inhibitor desselben ist;

(ii) die Verbindung Ro. 31-7549 allein keinen Einfluß auf das Follikelwachstum hat, sondern vielmehr das Wachstum des menschlichen Haarfollikels hemmt.

[0008] Ferner wird in der Datenbank WPI, Abschnitt Ch, Woche 9223 (Derwent), An 92-189207 XP002035591 (Zusamenfassung von JP-A- 04/124 122) vom 24. April 1992 ein Haarbehandlungsmittel offenbart, das das Ergrauen des Haares verhindert und darüberhinaus noch eine schwärzende Wirkung auf das Haar haben soll. Dieses Mittel enthält einen Proteinkinase C-Inhibitor; als Beispiele dafür sind Palmitoylcarnitin und Polymyxin B erwähnt. Es wird nichts über eine mögliche haarwachstumsfördernde Wirkung des Mittels oder dieser Verbindungen ausgesagt.

[0009] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben erstmals entdeckt, daß PKC-spezifische Inhibitoren zufriedenstellende Ergebnisse bei der Förderung des Haarwachstums liefern.

### Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, ein sicheres und wirkungsvolles Haarwuchsmittel zu liefern, das als aktiven Wirkstoff einen bestimmten PKC-spezifischen Inhibitor und pharmazeutisch verträgliche Vehikel enthält.

[0011] Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines PKC-spezifischen Inhibitors zur Herstellung einer Arzneimittelzusammensetzung, die als Haarwuchsmittel verwendet werden soll.

Detailierte Beschreibung der vorliegenden Erfindung

[0012] Der Proteinkinase C-spezifische Inhibitor, auf den sich diese Arbeit bezieht, ist ein von Polymyxin B und Palmitoyl-DL-Carnitin verschiedener Proteinkinase-Inhibitor mit einer PKC-inhibierenden Wirkung, jedoch einer möglichst geringen PKA-inhibierenden Wirkung. Konkret gesagt, sollte das Verhältnis seiner 50%-Hemmkonstante für PKA (hier nachstehend als PKA-$IC_{50}$ bezeichnet) zu seiner 50%-Hemmkonstante für PKC (hier nachstehend als PKC-$IC_{50}$ bezeichnet), PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$, nicht kleiner als 3,0 sein, wenn PKC-$IC_{50}$ und PKA-$IC_{50}$ nach dem folgenden PKC-inhibierenden bzw. dem folgenden PKA-inhibierenden Wirkungsmeßverfahren bestimmt werden. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Proteinkinase-Inhibitoren verwendbar, die einen PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ von 3 bis $10^9$ haben, und vorzuziehen sind jene mit einem PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ von 10 bis $10^9$.

[0013] Zur Bestimmung der PKA-inhibierenden Wirkung von Proteinkinase-Inhibitoren mit einer niedrigen PKA-Inhibitionswirkung erfordert das folgende Verfahren die Bestimmung einer großen Menge solchen Proteinkinase-Inhibitors; daher könnte in diesem Verfahren nur die Proteinkinase-Inhibitionswirkung des Proteinkinase-Inhibitors bis zu dessen höchster löslicher Konzentration im System gemessen werden. Dementsprechend wird, wenn ein solcher Proteinkinase C-Inhibitor mit niedriger PKA-Inhibitionswirkung benützt wird, der Wert des PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ der zahlenmäßig mit diesem Verfahren bestimmt werden kann, bis zu ungefähr $10^9$ betragen. Die Proteinkinase-Inhibitoren, die in der vorliegenden Erfindung nutzbar sind, haben PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$-Werte von nicht geringer als 3, ohne daß diese durch den höchsten Wert des PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ ($10^9$), der mit diesem Verfahren bestimmt werden kann, definiert wären.

(1) Verfahren zum Messen der PKC-inhibierenden Wirkung

[0014] Um die PKC-inhibierende Wirkung eines Proteinkinase-Inhibitors zu messen, wird Bezug auf das Verfahren von Kikkawa et al. (vgl. Journal of Biological Chemistry, 257, 13341, 1982) genommen.

[0015] Genau gesagt, werden 10 µl einer Probe, die auf ihre Wirkung getestet werden soll, zu 250 µl einer Lösung hinzugefügt, die 2,5 µM Magnesiumacetat, 50 µg Histon Typ IIIS (hergestellt von Sigma Co.), 20 µg Phosphatidylserin, 0,8 µM Diolein, 25 nM Calciumchlorid, 5 µg eines Rohenzyms (wie teilweise aus Rattenhirn nach dem Verfahren von Kikkawa et al. gereinigt) und 5 µM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) umfaßt, und darin 3 Minuten lang bei 30°C inkubiert.

[0016] Nach Ende der Inkubation werden 1,25 nM [g-$^{32}$P]ATP (von $5 \times 10^3$ bis $10 \times 10^3$ cpm/nM) zum System hinzugefügt und die Phosphorylierungsreaktion wird 3 Minuten lang bei 30°C ausgeführt; dann wird die Reaktion durch Hinzufügen von 25% Trichloressigsäure abgebrochen.

[0017] Das so erhaltene Reaktionsgemisch wird durch eine Zelluloseacetatmembran (Porengröße 0,45 µm; hergestellt von Toyo Filter Co.) gefiltert, die Membran viermal mit 5% Trichloressigsäure gewaschen, und danach wird die Radioaktivität des auf der Membran verbliebenen Restes gemessen; sie stellt den Wert der Probe dar.

[0018] Andererseits wird der gleiche Vorgang wie vorstehend beschrieben wiederholt, ohne daß die Probe zum System hinzugefügt wird; die erhaltene Radioaktivität ist ein Kontrollwert.

[0019] Die molare Konzentration der Probe mit jenem Radioaktivitätswert, der 50 Prozent des Kontrollwertes entspricht, stellt die 50%-Hemmkonstante für PKC (PKC-$IC_{50}$) der Probe dar.

(2) Verfahren zum Messen der PKA-inhibierenden Wirkung

[0020] Um die PKA-inhibierende Wirkung eines Proteinkinase-Inhibitors zu messen, wird Bezug auf das Verfahren von Kuo et al. (vgl. Biochemistry, 64, 1349, 1969) genommen.

[0021] Genau gesagt, werden 10 µl einer Probe, die auf ihre Wirkung getestet werden soll, zu 250 µl einer Lösung hinzugefügt, die 5 µM Tris-HCl-Puffer (pH 6.8), 2,5 µM Magnesiumacetat, 100 µg Histon Typ IIS (hergestellt von Sigma Co.), 0,25 nM c-AMP und 200 µg eines Rohenzyms (wie teilweise aus Kälberherz nach dem Verfahren von Kuo et al. gereinigt) umfaßt, und darin 3 Minuten lang bei 30°C inkubiert.

[0022] Nach Ende der Inkubation werden 1,25 nM [g-$^{32}$P]ATP (von $5 \times 10^3$ bis $10 \times 10^3$ cpm/nM) zum System hinzugefügt und die Phosphorylierungsreaktion wird 3 Minuten lang bei 30°C ausgeführt; dann wird die Reaktion durch Hinzufügen von 25% Trichloressigsäure abgebrochen.

[0023] Das so erhaltene Reaktionsgemisch wird durch eine Zelluloseacetatmembran (Porengröße 0,45 µm; hergestellt von Toyo Filter Co.) gefiltert, die Membran viermal mit 5% Trichloressigsäure gewaschen, und danach wird die Radioaktivität des auf der Membran verbliebenen Restes gemessen; sie stellt den Wert der Probe dar.

[0024] Andererseits wird der gleiche Vorgang wie bevorstehend beschrieben wiederholt, ohne daß die Probe zum System hinzugefügt wird; die erhaltene Radioaktivität ist ein Kontrollwert.

[0025] Die molare Konzentration der Probe mit jenem Radioaktivitätswert, der 50 Prozent des Kontrollwertes

entspricht, stellt die 50%-Hemmkonstante für PKA (PKA-$IC_{50}$) der Probe dar.

[0026] Konkrete Beispiele von Haarwuchsmitteln gemäß der Erfindung enthalten einen Proteinkinase C-spezifischen Inhibitor, der aus Calphostin C und Hexadecylphosphocholin oder deren pharmazeutisch verträglichen Salzen ausgewählt wird.

[0027] Konkrete Beispiele Proteinkinase C-spezifischer Inhibitoren zur Verwendung in der Erfindung sind unter anderen Polymyxin B, Calphostin C, Palmitoyl-DL-Carnitin und Hexadecylphosphocholin (Militefosin, hergestellt von Sigma Co.), und auch deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

[0028] Die pharmazeutisch verträglichen Salze können beispielsweise unter anderen folgende sein: Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfate, Nitrate, Formate, Acetate, Benzoate, Maleate, Fumarate, Succinate, Tartrate, Citrate, Oxalate, Methansulfonate, Toluolsulfonate, Aspartate und Glutamate.

[0029] Das Haarwuchsmittel der vorliegenden Erfindung kann in jeder Form genommen werden, vorausgesetzt daß es den Proteinkinase C-spezifischen Inhibitor der Erfindung in passender Form enthält. Zum Beispiel kann es ein flüssiges oder festes Haarwuchsmittel sein, das den Proteinkinase C-spezifischen Inhibitor der Erfindung zusammen mit pharmazeutisch akzeptablen Vehikeln enthält.

[0030] Bei dem festen oder flüssigen Haarwuchsmittel kann es sich um flüssige Präparate, wie Haarwasser, Haartonika, und Haarlotionen oder um feste Präparate, wie Salben und Haarcremes handeln. Diese Mittel können durch jedes beliebige herkömmliche Verfahren zubereitet werden, solange der Proteinkinase-Inhibitor der Erfindung zu einem geeigneten Vehikel hinzugefügt wird.

[0031] Die Menge des Proteinkinase C-spezifischen Inhibitors, der sich im Haarwuchsmittel der vorliegenden Erfindung befinden sollte, variiert stark, je nach der Intensität seiner inhibierenden Wirkung, und auch nach seiner endermischen Absorbierbarkeit, die sich von seinen physikalischen Eigenschaften herleitet, kann aber im allgemeinen von $10^{-6}$ bis 10 Gewichts-% (im folgenden als % bezeichnet) des Mittels, in Bezug auf den Gehalt einer einzelnen Verbindung des Inhibitors oder eines Gemisches von mehreren solchen sein.

[0032] Die bevorzugten Vehikel für die flüssigen Präparate sind jene, die allgemein in herkömmlichen Haarwuchsmitteln angewandt werden, wie reines Wasser, Ethanol, Polyalkohole, Öle und Fette. Wenn gewünscht, können dazu beliebige Zusätze hinzugefügt werden.

[0033] Zu den Polyalkoholen zählen beispielsweise Glycerin, 1,3-Butylglykol, Propylglykol, usw.

[0034] Zu den Ölen und Fetten zählen beispielsweise Weizenkeimöl, Kamelienöl, Jojobaöl, Olivenöl, Squalene, Färberdistelöl, Macadamianußöl, Avocadoöl, hydriertes Sojabohnen-Lecithin, usw.

[0035] Zu den Additiven zählen beispielsweise Duftstoffe, Tenside, Mikrobizide usw. Wenn gewünscht, können den Präparaten beliebige Antioxidantien, Hormone, Ultraviolettabsorbentien, entzündungshemmende Mittel, Kühlungsmittel, Feuchtigkeitsspender, Vitamine, Kräuterextrakte, Tinkturen usw. hinzugefügt werden.

[0036] Als Duftstoff ist jeder beliebige, in üblichen Kosmetika usw. gebräuchliche Duftstoff verwendbar.

[0037] Zu den Tensiden zählen beispielsweise Polyoxyethylen(60)-gehärtetes Rizinusöl, Polyoxyethylen(8)-oleylether, Polyoxyethylen(10)-oleylether, Polyoxyethylen(10)-monooleat, Polyoxyethylen(30)-glycerinmonostearat, Sorbitmonostearat, Polyoxyethylen(30)-glycerinmonostearat, Polyoxyethylen(20)-Sorbitmonooleat, Sucrose-Fettsäureester, Hexaglycerinmonooleat, Hexaglycerinmonolaurat, Polyoxyethylen-reduziertes Lanolin, Polyoxyethylen(20)-lanolinalkohol, Polyoxyethylen(25)-glycerin-pyroglutamat-isostearat-diester, N-Acetylglutamin-isostearylester, usw.

[0038] Zu den Mikrobiziden zählen beispielsweise Trichlorhydroxydiphenylether, Hinokitiol, Tricrosan, Chlorhexidingluconat, Phenoxyethanol, Resorcinol, Isopropylmethylphenol, Azulen, Salicylsäure, Zinkpyrithion, Benzalkonchlorid, Photorezeptor Nr. 301, Natriummononitroguaiacol, usw.

[0039] Zu den Antioxidantien zählen beispielsweise Butylhydroxyanisol, Propylgallat, und Erysorbinsäure.

[0040] Zu den Hormonen zählen beispielsweise Ethinylöstradiol, Östron, Östradiol, usw.

[0041] Zu den Ultraviolettabsorbentien zählen beispielsweise Benzophenone, wie Dihydroxybenzophenon; ebenso wie Melanine, Ethyl-para-Aminobenzoat, 2-Ethylhexyl-para-Dimethylaminobenzoat, Cinoxat, 2-Ethylhexyl-para-Methoxycinnamat, 2-(2-Hydroxy-5-Methylphenyl)-Benzotriazol, Urocansäure, feine Partikel von Metalloxiden, usw.

[0042] Zu den entzündungshemmenden Mitteln zählen beispielsweise Dikaliumglycyrrhetinat, β-Glycyrrhetinsäure, Allantoin, Diphenhydraminhydrochlorid, Guaiazulen, 1-Menthol usw.

[0043] Zu den Kühlungsmitteln zählen beispielsweise Kaperntinktur, 1-Menthol, usw.

[0044] Zu den Feuchtigkeitsspendern zählen beispielsweise L-Pyrrolidoncarboxylsäure, Natriumhyaluronat, Chondroitinsulfat, usw.

[0045] Zu den Vitaminen zählen beispielsweise d1-α-Tocopherolacetat, d1-α-Tocopherol, d-δ-Tocopherol, Vitamin E, Benzolnikotinat, Nikotinsäureamid, D-Pantothenyl-Alkohol, Pantothenyl-Ethylether, Biotin, Pyridoxinhydrochlorid, Riboflavin, usw.

[0046] Zu den Kräuterextrakten zählen beispielsweise Swertiaextrakt, Knoblauchextrakt, Ginsengextrakt, Aloeextrakt, Chinarindenextrakt, usw.

[0047] Zu den Tinkturen zählen beispielsweise Kaperntinktur, Ingwerextrakt, Cantharis-Tinktur, usw.

[0048] Wenn die vorstehend erwähnten flüssigen Präparate als Spray angewandt werden, können sie mit

nichtentflammbarem Gas oder dergleichen kombiniert werden.

[0049] Zu den Vehikeln für die festen Präparate zählen beispielsweise Vaseline, festes Paraffin, Pflanzenöl, Mineralöl, Lanolin, Wachs, und Macrogol. Zu diesen können, wenn gewünscht, beliebige der vorstehend erwähnten Additive hinzugefügt werden; Emulgatoren wie Lecithin; und niedere Alkohole wie Ethylalkohol, Isopropylalkohol, usw.

[0050] Die Menge des Haarwuchsmittel es nach der vorliegenden Erfindung, die anzuwenden ist, variiert je nach dem Alter, dem Körpergewicht, dem Zustand des konkreten Einzelfalles, der Heilwirkung des Mittels, der Art der Verabreichung, der Behandlungszeit usw. Für ein Haartonikum des Haarwuchsmittels der vorliegenden Erfindung zum Beispiel, kann die percutane Dosis von 0,5 bis 5 ml/Erwachsener, vorzugsweise von 1 bis 3 ml/Erwachsener betragen und ein- oder mehrmals pro Tag angewandt werden.

[0051] Nachstehend wird die vorliegende Erfindung detaillierter beschrieben, wobei auf die folgenden Beispiele, Referenzbeispiele und Testbeispiele Bezug genommen wird.

Beispiel 1: Herstellung des Haarwuchsmittel-Tonikums 1

[0052] Zuerst wurden 55 g Ethylalkohol, 7 g 1,3-Butylglykol, 0,5 g N-Acetylglutamin-Isostearylester und 0,25 g Polyoxyethylen(25)-Glycerin-Pyroglutamat-Isostearat-Diester gleichmäßig vermischt und verrührt; sie ergaben Lösung A.

[0053] Anschließend wurden, 0,3 g Polymyxin B-Sulfat (hergestellt von Sigma Co.) und 36,95 g reines Wasser gleichmäßig vermischt und verrührt; sie ergaben Lösung B.

[0054] Die Lösung B wurde unter Rühren zur Lösung A hinzugefügt und gleichmäßig vermischt; damit wurde ein Haarwuchsmittel-Tonikum hergestellt (Zusammensetzung 1).

Beispiel 2: Herstellung des Haarwuchsmittel-Tonikums 2

[0055] Zuerst wurden 90 g Ethylalkohol, 5 g 1,3-Butylglykol, 0,5 g N-Acetylglutamin-Isostearylester und 0,25 g Polyoxyethylen(25)-Glycerin-Pyroglutamat-Isostearat-Diester und 0,03 g Calphostin C (hergestellt von Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) gleichmäßig vermischt und verrührt; sie ergaben Lösung A.

[0056] Zur Lösung A wurden unter Rühren 4,22 g reines Wasser hinzugefügt und gleichmäßig vermischt und verrührt; damit wurde ein Haarwuchsmittel-Tonikum hergestellt (Zusammensetzung 2).

Beispiel 3: Herstellung des Haarwuchsmittel-Tonikums 3

[0057] Zuerst wurden 77 g Ethylalkohol, 10 g 1,3-Butylglykol, 0,5 g N-Acetylglutamin-Isostearylester und 0,25 g Polyoxyethylen(25)-Glycerin-Pyroglutamat-Isostearat-Diester und 3 g Palmitoyl-DL-Carnitin-Hydrochlorid (hergestellt von Sigma Co.) gleichmäßig vermischt und verrührt; sie ergaben Lösung A.

[0058] Zur Lösung A wurden unter Rühren 9,25 g reines Wasser hinzugefügt und gleichmäßig vermischt; damit wurde ein Haarwuchsmittel-Tonikum hergestellt (Zusammensetzung 3).

Beispiel 4: Herstellung des Haarwuchsmittel-Tonikums 4

[0059] Zuerst wurden 70 g Ethylalkohol, 10 g 1,3-Butylglykol, 0,5 g N-Acetylglutamin-Isostearylester und 0,25 g Polyoxyethylen(25)-Glycerin-Pyroglutamat-Isostearat-Diester und 1 g Hexadecylphosphocholin (hergestellt von Sigma Co.) gleichmäßig vermischt und verrührt; sie ergaben Lösung A.

[0060] Zur Lösung A wurden unter Rühren 18,25 g reines Wasser hinzugefügt und gleichmäßig vermischt; damit wurde ein Haarwuchsmittel-Tonikum hergestellt (Zusammensetzung 4).

Referenzbeispiel 1: Bestimmung der PKC-$IC_{50}$ und PKA-$IC_{50}$

[0061] Nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren zur Messung der PKC-inhibierenden und der PKA-inhibierenden Wirkung wurde die PKC-inhibierende und die PKA-inhibierende Wirkung von Polymyxin B-Sulfat, Calphostin C, Palmitoyl-DL-Carnitin-Hydrochlorid und Hexadecylphosphocholin gemessen, woraus sich ihre PKC-$IC_{50}$ und PKA-$IC_{50}$ ergaben.

[0062] Die erhaltenen Werte sind nachstehend in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

| Getestete Verbindung | PKC-$IC_{50}$ (µM) | PKA-$IC_{50}$ (µM) | PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ |
|---|---|---|---|
| Polymyxin B-Sulfat | 10 | >100 | >10 |
| Calphostin C | 0,05 | >50 | >1000 |
| Palmitoyl-DL-Carnitin-Hydrochlorid | 100 | >300 | >3 |
| Hexadecyl-Phosphocholin | 94 | >1000 | >10,6 |
| H-7 * | 15 | 13 | 0,87 |
| K252a * | 0,02 | 0,02 | 1 |
| Staurosporin * | 0,0027 | 0,0054 | 2 |

* Auszug aus *Bio/Technology,* 8, 732, 1990

Referenzbeispiel 2: Herstellung der Staurosporin-haltigen Tonika 5 bis 9

[0063] Zu einer vermischten Lösung aus 90 g Ethylalkohol, 5 g 1,3-Butylglykol, 0,5 g N-Acetylglutamin-Isostearylester und 0,25 g Polyoxyethylen(25)-Glycerin-Pyroglutamat-Isostearat-Diester wurden $1 \times 10^{-6}$ g, $3 \times 10^{-6}$ g, $1 \times 10^{-5}$ g, $3 \times 10^{-5}$ g bzw. $1 \times 10^{-4}$ g Staurosporin hinzugefügt, und jedes Gemisch wurde gleichmäßig vermischt und verrührt, womit man fünf verschiedene Lösungen erhielt.

[0064] Zu diesen Lösungen wurden jeweils 4,22 g reines Wasser unter Rühren hinzugefügt und anschließend durch gleichmäßiges Vermischen Haarwuchstonika mit 0,02 µM (Zusammensetzung 5), 0,06 µM (Zusammensetzung 6), 0,2 µM (Zusammensetzung 7), 0,6 µM (Zusammensetzung 8), 2 µM (Zusammensetzung 9) Staurosporin hergestellt.

Testbeispiel 1: Haarwachstumsfördernde Wirkung in Mäusehaarfollikel-Zellkultur

[0065] Es wurden Mäuse-Haarfollikelzellen nach dem modifizierten Verfahren von Tanigai et al. (vgl. Archives of Dermatological Research, 284, 290–296, 1992) gezüchtet und gewonnen, wobei dieses Verfahren in geeigneter Weise modifiziert wurde.

[0066] Das heißt, die Haut wurde vom Rücken einer 4 Tage alten C3H-Maus (von Nippon Charles River Co. bezogen) abgenommen und mit einem MEM (Minimum Essential Medium, Eagle) mit 500 Einheiten/ml Dispense (hergestellt von Godo Shusei Co.) und 5% FCS 16 Stunden lang bei 4°C behandelt.

[0067] Von dieser Hautprobe wurde die Epidermis entfernt und die so erhaltene Dermisschicht mit einem DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 0,25% Kollagenase N-2 (hergestellt von Nitta Gelatin Co.) und 10% FCS 1 Stunde lang bei 37°C verarbeitet, wodurch man eine Dermissuspension erhielt.

[0068] Diese Dermissuspension wurde durch ein 212 Mikron-Nylonnetz (hergestellt von Nippon Rikagaku Kikai KK) filtriert, und das so erhaltene Filtrat wurde 5 Minuten lang bei 1000 U/min zentrifugiert, wodurch man Haarfollikelgewebe-haltige Präzipitate erhielt.

[0069] Die so erhaltenen Präzipitate wurden in einer Ca-Mg-freien PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung; Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) mit einer Pipette suspendiert und dann 15 Minuten lang ruhen gelassen, wodurch das Haarfollikelgewebe gefällt wurde.

[0070] Das so erhaltene Haarfollikelgewebe wurde insgesamt dreimal nach dem vorstehend beschriebenen Prozeß bearbeitet, der das Hinzufügen von Ca-Mg-freier PBS, Suspension mit einer Pipette und 15-minütige Fällung umfaßt.

[0071] Das so erhaltene Haarfollikelgewebe wurde schließlich 5 Minuten lang bei 37°C mit 0,1% EDTA–0,25% Trypsin (hergestellt von Gibco Co.) behandelt, und dazu wurde DMEM mit 10% FCS hinzugefügt. So wurde eine Haarfollikelgewebe-Zellsuspension hergestellt, die $3 \times 10^5$ Zellen/ml enthielt.

[0072] Diese Haarfollikelgewebe-Zellsuspension wurde in einer Menge von 1 ml/Vertiefung in eine Kollagen-beschichteten Schale mit 24 Vertiefungen (hergestellt von Iwaki Glass Co.) pipettiert und 24 Stunden lang bei 37°C in 5% $CO_2$ gezüchtet.

[0073] Die so erhaltene Kultur wurde einem Medientausch gegen ein MCDB 153-Medium (hergestellt von Kyokuto Pharmaceutical Co.) unterworfen, das folgende Bestandteile enthält: 5 mg/l Insulin vom Rind (hergestellt

von Sigma Co.), 5 µg/l Mäuse-EGF (hergestellt von Takara Shuzo Co.), 40 mg/l Rinderhypophysenextrakt (hergestellt von Kyokuto Pharmaceutical Co.), 10 mg/l menschliches Transferrin (hergestellt von Sigma Co.), 0,4 mg/l Hydrocortison (hergestellt von Sigma Co.), 0,63 µg/l Progesteron (hergestellt von Collaborative Research Co.), 14 mg/l O-Phosphoethanolamin (hergestellt von Sigma Co.), 6,1 mg/l Ethanolamin (hergestellt von Sigma Co.), 50 U/ml Penicillin (hergestellt von Wako Co.), 50 µg/ml Streptomycin (hergestellt von Wako Co.), und eine DMSO-Lösung, die einen PKC-Inhibitor der Erfindung umfaßt (dieser wurde in einer Menge von 1/100 des Volumens bezogen auf das Medium hinzugefügt); die Kultur wurde dann 5 Tage lang bei 37°C in 5% $CO_2$ weitergezüchtet. Während der Inkubation wurde das Medium jeden zweiten Tag gegen frisches Medium ausgetauscht.

[0074] Wie die Kontrolle, so wurde auch die Zellkultur in gleicher Weise wie oben beschrieben gezüchtet, außer daß nur DMSO von 1/100 des Volumens bezogen auf das Medium statt der PKC-Inhibitor-haltigen DMSO-Lösung zum Medium hinzugefügt wurde.

[0075] Um das Ausmaß des Zellwachstums zu bestimmen, wird auf ein bekanntes Verfahren Bezug genommen, das Neutralrot verwendet (vgl. Journal of Tissue Culture Method, 9, 1, 7–9, 1984).

[0076] Die erhaltene Kultur wurde durch Absaugen extrahiert und dann 3 Stunden lang bei 37°C in 5% $CO_2$ in einem MCDB 153-Medium weitergezüchtet, zu dem 50 mg/l Neutralrot (hergestellt von Sigma Co.) hinzugefügt worden waren. Der Überstand wurde von der Kultur entfernt und die verbliebenen Zellen mit einer 1%-igen Formalinlösung mit 1% Calciumchlorid gewaschen und dann fixiert.

[0077] Nach dem Waschen und Fixieren wurde der Überstand entfernt, und zum Rest wurde eine 50%-ige Ethanollösung mit 1% Essigsäure in einer Menge von 0,4 ml/Vertiefung von 2 $cm^2$ hinzugefügt, wodurch das Neutralrot extrahiert wurde.

[0078] Die Absorption des Extraktes bei 540 nm wurde gemessen, und daraus ergab sich der Grad des Zellwachstums.

[0079] Die zellwachstumsfördernde Wirkung einer jeden der getesteten Verbindungen ist nachstehend in Tabelle 2 gezeigt. Wie daraus hervorgeht, weist jede Verbindung der Erfindung eine ausgezeichnete Haarwachstumswirkung auf Mäuse-Haarfollikelzellen auf.

[0080] Andererseits wurden die Proteinkinase-Inhibitoren K252a und Staurosporin, die ein Verhältnis PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ kleiner als 3 haben, in der gleichen Weise wie vorstehend beschrieben getestet, und die erhaltenen Daten werden nachstehend in Tabelle 3 gezeigt. Wie daraus hervorgeht, inhibierten diese Proteinkinase-Inhibitoren das Wachstum von Mäuse-Haarfollikelzellen.

Tabelle 2

| Getestete Verbindung | Konzentration (µM) | Relativer Grad des Zellwachstums, bezogen auf den Wachstumsgrad 100 der Kontrolle |
|---|---|---|
| Polymyxin B-Sulfat | 10 | 360 |
| Calphostin C | 0,1 | 160 |
| Palmitoyl-DL-Carnitin-Hydrochlorid | 10 | 170 |

Tabelle 3

| Getestete Verbindung | Konzentration (µM) | Relativer Grad des Zellwachstums, bezogen auf den Wachstumsgrad 100 der Kontrolle |
|---|---|---|
| K252a | $1 \times 10^5$ | 80 |
| | $1 \times 10^4$ | 77 |
| | $1 \times 10^3$ | 76 |
| | $1 \times 10^2$ | 29 |
| | $1 \times 10^1$ | 0 |
| Staurosporin | $1 \times 10^5$ | 78 |
| | $1 \times 10^4$ | 69 |
| | $1 \times 10^3$ | 72 |
| | $1 \times 10^2$ | 34 |
| | $1 \times 10^1$ | 0 |

Testbeispiel 2: Auswirkung auf das Haarwachstum von Mäusen

[0081] Die wie vorstehend zubereiteten Zusammensetzungen wurden unter Bezugnahme auf das Verfahren von Ogawa et al. (vgl. The Journal of Dermatology, Bd. 10, S. 45–54, 1983) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Haarwachstum von Mäusen getestet.

[0082] Genau gesagt, wurden 9 Wochen alte, männliche C3H/HeSlc-Mäuse, deren Haarwachstumszyklus sich gerade in der Ruhephase befand, zu Gruppen von vier oder fünf Tieren zusammengefaßt. Das Haar auf dem Rücken wieder Maus wurde mit elektrischen Haarschneidern und einem Elektrorasierer sorgfältig rasiert, und jede der Zusammensetzungen 1 bis 9, wie in den Beispielen 1 bis 4 und dem Referenzbeispiel 2 zubereitet, wurde gleichmäßig auf den rasierten Bereich jeder Maus aufgetragen, und zwar eine Zusammensetzung pro Tag in einer Menge von 200 µl/Teil.

[0083] Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde die gleiche Zusammensetzung wie vorstehend aufgetragen, außer der Tatsache, daß sie den Proteinkinase-Inhibitor der Erfindung nicht enthielt. Am 18. Tag nach dem Beginn des Auftragens der Zusammensetzung auf die Mäuse wurde die rasierte Haut vom Rücken jeder Maus abgezogen und photographiert. Die photographischen Aufnahmen wurden mit einem Bildverarbeiter (hergestellt von Avionics Co., Spicca In dargestellt, wobei der Prozentanteil der haarbewachsenen Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche der rasierten Haut den Grad des Haarwachstums angab. Der Prozentwert des Haarwachstums der Gruppe der behandelten Tiere, subtrahiert von dem der Kontrolltiere ergab den Anteil der Fläche mit verstärktem Haarwachstum in Prozent.

[0084] Die dabei erhaltenen Daten sind in Tabelle 4 und 5 nachstehend gezeigt. Wie in Tabelle 4 gezeigt, weisen die Haarwuchsmittel, die den Proteinkinase C-spezifischen Inhibitor der Erfindung (Zusammensetzung 1 bis 4) enthalten eine ausgezeichnete haarwuchsfördernde Wirkung auf das Mäuse-Haarfollikel auf.

[0085] Andererseits weisen, wie in Tabelle 5 gezeigt, die Zusammensetzungen 5 bis 9, die Staurosporin enthalten, das ein Proteinkinase-Inhibitor mit einem PKA-$IC_{50}$/PKC-$IC_{50}$ kleiner als 3 ist (Zusammensetzung 5 bis 9) keine oder eine geringe solche Wirkung auf.

Tabelle 4

| Testzusammensetzung | Prozentanteil der Fläche mit verstärktem Haarwuchs (%) |
|---|---|
| Zusammensetzung 1 | 58 |
| Zusammensetzung 2 | 65 |
| Zusammensetzung 3 | 51 |
| Zusammensetzung 4 | 70 |

Tabelle 5

| Testzusammensetzung | Staurosporinkonzentration (µM) | Prozentanteil der Fläche mit verstärktem Haarwuchs (%) |
|---|---|---|
| Zusammensetzung 5 | 0,02 | – 2 |
| Zusammensetzung 6 | 0,06 | – 5 |
| Zusammensetzung 7 | 0,20 | 3 |
| Zusammensetzung 8 | 0,60 | – 8 |
| Zusammensetzung 9 | 2,00 | – 14 |

[0086] Wie vorstehend im Detail beschrieben, liefert die vorliegende Erfindung ein sicheres und wirkungsvolles Haarwuchsmittel, das einen Proteinkinase C-spezifischen Inhibitor umfaßt.

**Patentansprüche**

1. Haarwuchsmittel enthaltend als aktiven Bestandteil einen Proteinkinase-C-spezifischen Inhibitor, in dem das Verhältnis seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase A zu seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase C nicht kleiner als 3,0 ist, außer Polymyxin B und Palmitoyl-DL-Carnitin, und pharmazeutisch verträgliche Träger.

2. Haarwuchsmittel nach Anspruch 1, wobei der Proteinkinase-C-spezifische Inhibitor ein Proteinkinaseinhibitor ist, in dem das Verhältnis seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase A zu seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase C bei 3,0 bis $10^9$ liegt.

3. Haarwuchsmittel nach Anspruch 1, wobei der Proteinkinase-C-spezifische Inhibitor ein Proteinkinaseinhibitor ist, in dem das Verhältnis seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase A zu seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase C bei 10 bis $10^9$ liegt.

4. Haarwuchsmittel nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei der Proteinkinase-C-spezifische Inhibitor ausgewählt ist aus Calphostin C, Hexadecylphosphocholin und ihren pharmazeutisch verträglichen Salzen.

5. Haarwuchsmittel nach Anspruch 1, wobei die im Haarwuchsmittel zu enthaltende Menge des Proteinkinase-C-spezifischen Inhibitors $10^{-6}$ bis 10 Gew.-% basierend auf dem Mittel ist.

6. Verwendung eines Proteinkinase-C-spezifischen Inhibitors, wobei das Verhältnis seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase A zu seiner 50%-Hemmkonstante für Proteinkinase C nicht kleiner als 3,0 ist, für die Herstellung eines Arzneimittels, das als Haarwuchsmittel verwendet werden soll.

7. Verwendung eines Proteinkinase-C-spezifischen Inhibitors nach Anspruch 6, wobei der Proteinkinase-C-spezifische Inhibitor ausgewählt ist aus Polymyxin B, Calphostin C, Palmitoyl-DL-Carnitin, Hexadecyl-

phosphocholin und ihren pharmazeutisch verträglichen Salzen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen