



(51) МПК
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 17/06 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 9/10 (2019.05); A61K 35/28 (2019.05); A61P 17/06 (2019.05); G09B 23/28 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2019118187, 11.06.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 11.06.2019

Дата регистрации:
 28.10.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.06.2019

(45) Опубликовано: 28.10.2019 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
 Победы, 85, стр. НИУ "БелГУ", ОИС,
 Цуриковой Н.Д.

(72) Автор(ы):

Бурда Юрий Евгеньевич (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Сарычева Марина Владиславовна (RU),
 Надеждин Сергей Викторович (RU),
 Бондарев Вячеслав Павлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Белгородский государственный
 национальный исследовательский
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: US 2017020914 A1, 26.01.2017. EP
 2620156 A2, 31.07.2013. WO 2018073837 A1,
 26.04.2018. US 2016243250 A1, 25.08.2016. EP
 2298861 A2, 23.03.2011. RU 2662564 C2,
 26.07.2018.

(54) Крем с секретомом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции псориазiformного воспаления в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии, и представляет собой крем с секретомом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции псориазiformного воспаления в эксперименте, содержащий 8 – 10 мл секрета мультипотентных мезенхимальных

стромальных клеток, содержащего 10-1000 мкг белка на 1 мл питательной среды, и до 100 мл индифферентной кремовой основы. Изобретение обеспечивает купирование острого псориазiformного кожного воспаления в эксперименте. 7 ил., 1 табл.

RU
 2 7 0 4 3 2 2
 C 1

RU
 2 7 0 4 3 2 2
 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 17/06 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 9/10 (2019.05); A61K 35/28 (2019.05); A61P 17/06 (2019.05); G09B 23/28 (2019.05)

(21)(22) Application: **2019118187, 11.06.2019**

(24) Effective date for property rights:
11.06.2019

Registration date:
28.10.2019

Priority:

(22) Date of filing: **11.06.2019**

(45) Date of publication: **28.10.2019** Bull. № 31

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, str. NIU "BelGU", OIS, Tsurikovoj
N.D.**

(72) Inventor(s):

**Burda Yuriy Evgenevich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Sarycheva Marina Vladislavovna (RU),
Nadezhdin Sergej Viktorovich (RU),
Bondarev Vyacheslav Pavlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **CREAM WITH SECRETORY OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR CORRECTION OF PSORIASIFORM INFLAMMATION IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to experimental pharmacology, and represents a cream with the secretory of multipotent mesenchymal stromal cells for correction of psoriasiform inflammation in experiment containing 8–10 ml of the

secretory of multipotent mesenchymal stromal cells containing 10–1,000 mcg of protein per 1 ml of nutrient medium, and up to 100 ml of an indifferent cream base.

EFFECT: invention provides relief of acute psoriasiform skin inflammation in experiment.

1 cl, 7 dwg, 1 tbl

C 1
2 7 0 4 3 2 2
R U

R U
2 7 0 4 3 2 2
C 1

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

Известно техническое решение, в котором применяют состав для распыления, содержащий клобетазол, для лечения псориаза (RU № 2397769, публ. 10.06.2009). В известном решении на пораженную псориазом кожу ежедневно в течение 4 недель распыляют композицию, содержащую эффективное количество пропионата клобетазола. Кроме того, композиция включает этиловый спирт, изопропилмиририлат и анионный сурфактант.

Недостатком указанного способа является то, что, как известно, топические кортикостероиды имеют множество побочных эффектов в виде диспигментации, гипертрихоза, а также стероид-зависимого дерматита, тахифилаксии, развития кушингоида (Sharma R., Abrol S., Wani M. Misuse of topical corticosteroids on facial skin. A study of 200 patients. *J Dermatol Case Rep.* 2017 Mar 31;11(1):5-8. doi: 10.3315/jdcr.2017.1240);

Meena S, Gupta L.K., Khare A.K., Balai M., Mittal A., Mehta S., Bhatni G. «Topical Corticosteroids Abuse: A Clinical Study of Cutaneous Adverse Effects», *Indian J Dermatol.* 2017 Nov-Dec;62(6):675. doi: 10.4103/ijd.IJD_110_17;

Singh S.K., Nasir F. «The reservoir effect of topical steroids in vitiliginous skin: A cross-sectional study», *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2015 Jul-Aug;81(4):370-5. doi: 10.4103/0378-6323.159933;

Н.С. Потекаев, А.Н. Львов, В.В. Фадеев, В.В. Самойленко «Тяжелые системные побочные эффекты топической стероидной терапии псориаза», *Клиническая дерматология и венерология* 1, 2013.

Известно техническое решение крем лечебно-профилактический "Чистопсор" (RU № 2307646, публ. 10.10.2007), включающий чистотел большой, череду трехраздельную и вазелин медицинский, дополнительно содержит корень щавеля конского, яичный белок, цветочный пчелиный мед и лецитин.

Недостатком данного средства является большое количество растительных компонентов, которые могут вызвать аллергические реакции в виде кожной сыпи, зуда. (Kim J.D., Kim S.Y., Kwak E.J., Sol I.S., Kim M.J., Kim Y.H., Kim K.W., Sohn M.H. «Reduction Rate of Specific IgE Level as a Predictor of Persistent Egg Allergy in Children», *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019 Jul;11(4):498-507. doi: 10.4168/aair.2019.11.4.498;

Bellón T. «Mechanisms of Severe Cutaneous Adverse Reactions: Recent Advances», *Drug Saf.* 2019 Apr 24. doi: 10.1007/s40264-019-00825-2;

Pokladnikova J, Meyboom R.H., Meincke R., Niedrig D., Russmann S. «Allergy-Like Immediate Reactions with Herbal Medicines: A Retrospective Study Using Data from VigiBase», *Drug Saf.* 2016 May;39(5):455-64. doi: 10.1007/s40264-016-0401-5).

Таким образом, проблема поиска новых лекарственных препаратов для лечения псориаза остается актуальной задачей. Одними из перспективных направлений в этой области является использование секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Известно противовоспалительное и иммуносупрессивное действие ММСК за счет ингибирования активности цитотоксических Т-лимфоцитов, дендритных клеток, макрофагов, стимуляции регуляторных Т-лимфоцитов, с соответствующими сдвигами в продукции цитокинов, в том числе – снижение дифференцировки Th17 и повышение дифференцировки и активности регуляторных Т-лимфоцитов (Bassi, E.J., Aita, C.A. and Camara, N.O. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells.* 2011, Vol. 3, 1; Mengyuan, W., Quan, Y., Liang X. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. 2018. Article ID 3057624; Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., et al. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function

and induce a T regulatory cell phenotype. J Immunol. 2010, Vol. 185, pp. 302–312).

Особенность использования ММСК в медицине связана с возможностью их аллогенного введения, обусловленного такими свойствами этих клеток, как иммунопривелигерованность и способность к иммуносупрессии, которые к настоящему времени достаточно подробно изучены (Uccelli et al., 2006; Nauta & Fibbe, 2007; Jones & McTaggart 2008; Ankrum et al., 2014; Castro-Manrreza & Montesinos, 2015).

Известно, что мультипотентные мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (ММСК) (Caplan, 1991; Horwitz et al., 2005) способны мигрировать в поврежденные ткани-мишени, обеспечивая репарацию, поддерживать гемопоэз, а также подавлять иммунный ответ при аутологичном и аллогенном введении (Caplan, 2007; Da Silva Meirelles et al., 2008; Murphy et al., 2013).

Кроме того, ММСК костного мозга обладают высокой миграционной способностью, секретируют большое число биологически активных молекул и обладают иммуномодулирующим действием. Этими ключевыми свойствами ММСК костного мозга и обусловлена возможность их эффективного применения в качестве источников стволовых клеток для лечения гематологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых заболеваний, травм и заболеваний костно-суставной системы (Wang et al., 2011; Bernardo et al., 2012). Известно применение ММСК с противовоспалительной (Патент на изобретение № 2604672 Способ лечения септического шока в состоянии агранулоцитоза») и иммуносупрессивной (Патент на изобретение № 2298410 C1, 10.05.2007 - биотрансплантат для лечения аутоиммунных и ревматических заболеваний, содержащий мезенхимальные стволовые клетки) целью, а их секретом в регенеративной медицине - патент № 217.015.СА5С 25.08.2017 «Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека» и патент № 2280459 C1 – «средство для изменения скорости роста или репродукции клеток и для лечения, в том числе ран и ожогов, содержащее кондиционированную клеточную культуральную среду».

Задачей предполагаемого изобретения является создание более эффективного средства – крема, включающего использование секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, обладающего противовоспалительной и иммуносупрессивной активностью за счет комплекса гуморальных факторов для коррекции псориазиформного воспаления.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого крема с секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции псориазиформного воспаления в эксперименте, содержащего секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и индифферентный детский крем, в следующем соотношении, в мл.:

- 8 - 10 секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, содержащего 10-1000 мкг белка на 1 мл питательной среды

- индифферентную кремовую основу – до 100.

Такое соотношение компонентов приводит к коррекции воспаления при моделируемой патологии. Данный эффект связан с выраженным противовоспалительным и иммуносупрессивным действием комплекса гуморальных факторов, составляющих секретом ММСК.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ.

Приготовление крема с секретом ММСК

В стерильных условиях в объем посуды вносили 10 мл секретом ММСК, содержащего 10-1000 мкг белка на 1 мл питательной среды. Секретом ММСК получают

путем сбора питательной бессывороточной среды (MEM, DMEM, DMEM/F12, α -MEM, IMEM, изотонического солевого раствора, с рН 6,7-7,4, в любых их сочетаниях), в которой культивировали $1 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ ММСК на 1 мл, в течение 1-4 суток. Затем добавили объемом до 100 мл индифферентный крем (детский крем). После чего

5 тщательно смешивали в течение 5-10 минут до получения однородной консистенции, затем полученный крем переключивали в стерильную упаковку. Хранение крема перед использованием и в процессе эксперимента осуществляли при температуре $+4^\circ\text{C}$.

Изобретение поясняется иллюстрациями, на которых:

Фиг. 1 и Фиг. 2 - развитие воспаления, после которого начиналось лечение;

10 Фиг. 3 – результат лечения в группе с отрицательным контролем (животные получали детский крем);

Фиг. 4 - результат лечения кремом, содержащим секретом ММСК.

Морфометрические показатели представлены на Фиг. 5-7:

Фиг. 5 - показатели общей клеточности препаратов. * - $p < 0,05$;

15 Фиг. 6 - показатели толщины дермы. * - $p < 0,05$;

Фиг. 7 - выраженность акантоза. * - $p < 0,05$.

Опыты проводят на белых крысах самцах линии Wistar 214 до 256 г, на которых было смоделировано псориазиформное воспаление. Псориазиформное воспаление вызывали путем ежедневного нанесения на кожу спины по 50 мкл 1% суспензии

20 Imiquimod (Xi'an Leader Biochemical Engineering Co., Ltd, China) в оливковом масле с ДМСО и с 1 мл ацетона в соотношении 1:8:1, в течение 4 дней.

После развития выраженного воспаления с появлением крупнопластинчатого шелушения, эскориаций, с обеих сторон начинали лечение: с одной стороны каждое животное получало детский крем (отрицательный контроль), с другой стороны – крем

25 с добавлением секрета ММСК в соответствующей группе, нанесение осуществляли 1 раз в день в течение 3 дней. На 8-й день эксперимента животных подвергали эвтаназии и забирали фрагменты кожи на гистологическое исследование.

Фрагменты кожи фиксировали 4% формальдегидом, окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрические исследования проводили на микроскопе AxioScore A1

30 в программном пакете Fiji (ImageJ 2.0). Статистическую обработку проводили в MS Excel 2013 с использованием критерия Даннета.

При статистической обработке данных рассчитывается среднее значение, величину стандартного отклонения. Различия считаются достоверными при $p < 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ.

35 Выявлена эффективность местного применения секрета ММСК в купировании псориазиформного воспаления у крыс линии Wistar как по клиническим признакам, так и по морфометрическим показателям. Так общая клеточность препаратов в отрицательном контроле (животные получали детский крем) составила $876,9 \pm 77,5$ ($M \pm sd$), а в опытной группе – $589,4 \pm 105,4$. Толщина дермы в мкм в контроле – $893,0 \pm 71,1$,

40 а в случае применения секрета ММСК – $629,1 \pm 48,0$. Также под влиянием факторов, продуцируемых ММСК, статистически значимо уменьшался такой характерный для псориазического поражения кожи признак, как акантоз: $253,6 \pm 35,9$ мкм в опытной группе, получавшей крем с ММСК и $677,1 \pm 80,6$ мкм в отрицательном контроле (применялся детский крем). Данные полученных исследований приведены в таблице 1.

45 Таблица 1

Группа животных	<i>общая клеточность препаратов, мкм</i>	<i>Толщина дермы, мкм</i>	<i>Акантоз, мкм</i>
5 отрицательный контроль (животные получали детский крем)	876,9±77,5	893,0±71,1	677,1±80,6
10 Животные, получавшие лечение кремом, содержащим секретом МСК	589,4±105,4	629,1±48,0	253,6±35,9

Таким образом, противовоспалительная и иммуносупрессивная активность комплекса гуморальных факторов, составляющих секретом ММСК, обеспечила купирование острого псориазиформного кожного воспаления.

(57) Формула изобретения

Крем с секретомом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции псориазиформного воспаления в эксперименте, характеризующийся содержанием секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и индифферентного крема, в следующем соотношении, мл:

- 8 - 10 секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, содержащего 10-1000 мкг белка на 1 мл питательной среды;
- остальное индифферентная кремовая основа до 100.

1



Фиг. 1



Фиг. 2

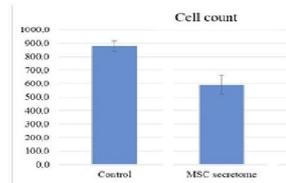


Фиг. 3

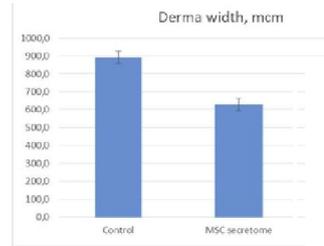


Фиг. 4

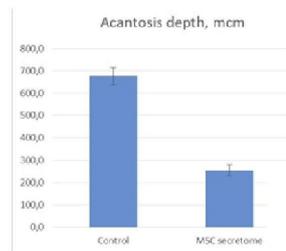
2



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7