



(51) МПК  
*A61K 33/44* (2006.01)  
*A61K 47/06* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 33/44* (2006.01); *A61K 47/06* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016149440, 15.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 15.12.2016

Дата регистрации:  
 15.01.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.12.2016

(45) Опубликовано: 15.01.2018 Бюл. № 2

Адрес для переписки:

115478, Москва, Каширское ш., 24, первому зам.  
 директора ФГБУ "ГНЦ Институт  
 иммунологии" ФМБА России А.И. Мартынову

(72) Автор(ы):

Андреев Сергей Михайлович (RU),  
 Шершакова Надежда Николаевна (RU),  
 Барабошкина Елена Николаевна (RU),  
 Шатилов Артем Андреевич (RU),  
 Шабанова Дарья Дмитриевна (RU),  
 Хаитов Муса Рахимович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение "Государственный научный  
 центр "Институт иммунологии"  
 Федерального медико-биологического  
 агентства России (ФГБУ "ГНЦ Институт  
 иммунологии" ФМБА России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: US 7947262 B2, 24.05.2011.

Фуллерены: биомедицинский аспект /  
 Андреев С.М., Башкатова Е.Н., Пургина  
 Д.Д., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р. //  
 Иммунология. Водная нанодисперсия  
 фуллерена C<sub>60</sub> проявляет  
 противовоспалительную активность в  
 модели атопического дерматита на мышцах  
 / Башкатова Е.Н., Шершакова Н.Н.,  
 Пургина Д.Д., Хаитов М.Р., Андреев С.М.  
 (см. прод.)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в  
 частности к композиции для терапии  
 атопического дерматита в форме мази.  
 Композиция включает водный раствор фуллерена  
 C<sub>60</sub>, вазелин, пальмитат сахарозы, а также  
 парабены - нипазол и нипагин в весовом

соотношении 4:3,78:2,2:0,001:0,001, при этом  
 конечное содержание фуллерена в композиции  
 составляет от 0,005 до 0,012 мас. %.  
 Осуществление изобретения позволяет снизить  
 воспалительную лейкоцитарную инфильтрацию  
 эпидермиса.

(56) (продолжение):

//Современная химическая физика XXVI Симпозиум. Сборник тезисов. 20 сентября - 1 октября  
 2014 г. г.Туапсе. С.154.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 33/44* (2006.01)  
*A61K 47/06* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 33/44 (2006.01); A61K 47/06 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)*(21)(22) Application: **2016149440, 15.12.2016**(24) Effective date for property rights:  
**15.12.2016**Registration date:  
**15.01.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **15.12.2016**(45) Date of publication: **15.01.2018** Bull. № 2

Mail address:

**115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, pervomu zam.  
direktora FGBU "GNTS Institut immunologii"  
FMBA Rossii A.I. Martynovu**

(72) Inventor(s):

**Andreev Sergej Mikhajlovich (RU),  
Shershakova Nadezhda Nikolaevna (RU),  
Baraboshkina Elena Nikolaevna (RU),  
Shatilov Artem Andreevich (RU),  
Shabanova Darya Dmitrievna (RU),  
Khaitov Musa Rakhimovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr  
"Institut immunologii" Federalnogo  
mediko-biologicheskogo agentstva Rossii (FGBU  
"GNTS Institut immunologii" FMBA Rossii)  
(RU)**(54) **COMPOSITION FOR ATOPIC DERMATITIS THERAPY BASED ON FULLEREN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: composition includes an aqueous solution of fullerene C<sub>60</sub>, vaseline, sucrose palmitate, as well as parabens - nipasol and nipagin in a weight

ratio of 4:3.78:2.2:0.001:0.001. The final content of fullerene in the composition is 0.005 to 0.012 wt %.

EFFECT: invention allows reduction of inflammatory leukocyte infiltration of the epidermis.

1 cl

RU 2 641 041 C 1

RU 2 641 041 C 1

Изобретение относится к фармакологии и медицине, преимущественно к лекарственным препаратам в форме мази, и может найти применение при лечении атопического дерматита и других воспалительных заболеваний, связанных с аллергической реакцией.

5 Атопический дерматит (АД) имеет очень широкое распространение, включая острую и хроническую формы, во всем мире им страдают до 30% детей и до 5% взрослых. Заболевание является социально значимой проблемой, оно существенно влияет на качество жизни больных, ограничивает их работоспособность, вплоть до инвалидизации. Основа патогенеза - доминирование Независимого иммунного ответа с продукцией  
10 антител IgE-класса, усиленная дегрануляцией тучных клеток, дефицит филагрина, играющего ключевую роль в барьерной функции кожи [Peng W., Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. Clin. Exp. Allergy, 2015, 45 (3). DOI: 10.1111/cea.12495; Leung D.Y.M., Boguniewicz M., Howell M.D., Hamid Q. New insights into atopic dermatitis. J. Clin. Invest., 2004, 113: 651-657; Novak N., Bieber T., Leung D.Y.M. Immune mechanisms leading to atopic  
15 dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 112: 128-138]. Типичная клиническая картина АД характеризуется зудом кожных покровов, стойкой гиперемией или преходящей эритемой, папуловезикулезными высыпаниями, экссудацией, сухостью кожи, шелушением, эксфолиациями, лихенификацией, носящими распространенный или ограниченный характер. Иммунный ответ характеризуется выработкой Th2 клетками  
20 таких цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-13, а также TNF- $\alpha$ , что приводит к повышению уровня IgE и лейкоцитарной инфильтрации дермы [Sinke J.D., Rutten V.P.M.G., Willemse T. Immune dysregulation in atopic dermatitis. Vet. Immunol. Immunopathol., 2002, 87: 351-356]. Значительный вклад в развитие воспаления дают тучные клетки, базофилы крови, секретирующие аллергомедиаторы: гистамин, гепарин, лейкотриены, простагландины,  
25 брадикинин, серотонин [Ryan JJ, Kashyap M, Bailey D, Kennedy S, Speiran K, Brenzovich J, Barnstein B, Oskeritzian C, Gomez G. Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. Crit. Rev. Immunol., 2007, 27: 15-32]. Считается, что предпосылкой для развития АД является генетическая предрасположенность к заболеванию. В частности, известно, что у 15-20% пациентов с АД мутирован ген, кодирующий важнейший белок кожного  
30 барьера филаггрин. Эта мутация косвенно подтверждает генетическую предрасположенность к АД, которая может передаваться по наследству [Oyoshi M.K., Murphy G.F., Geha R.S. Filaggrin deficient mice exhibit Th17-dominant skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. J. Allergy Clin. Immunol., 2009, 124: 485-493]. В острой фазе АД его индикаторами являются цитокины, IL-4, IL-5  
35 и IL-13, секретируемые Th2 клетками кожи. В хронической фазе, доминирующими становятся Th1 и Th17 клетки вместе с высвобождаемым токсически интерфероном-гамма. В отношении причин возникновения АД высказываются различные гипотезы, причиной могут быть эндогенные, генетически обусловленные факторы, а также и экзогенные, связанные с внешним окружением. Одним из вероятных механизмов считают  
40 нарушение баланса редокс-гомеостаза кожи. Воспалительная реакция, в том числе и при АД, может индуцироваться в результате окислительного стресса, сопровождающегося генерацией активных форм кислорода (АФК), свободных радикалов и оксида азота, как повреждающих факторов. Воспаление же представляет собой комплексный биологический ответ тканей на такие факторы. У больных АД  
45 значительно изменяется профиль уринарных маркеров окислительного стресса, включая повышение уровней 8-гидроксидезоксиганидина нитрит/нитратов, селена, предполагая ухудшение гомеостаза редокс-системы. При обострениях АД наблюдается заметное повышение уровня липидных перекисей, маркером которых служит нарастание

концентрации малонового диальдегида (МДА), снижение уровня антиоксидантных витаминов А, С и Е, нарастание продуктов окисления билирубина [Amin M.N., Liza K.F., Sarwar M.S. et al. Effect of lipid peroxidation, antioxidants, macro minerals and trace elements on eczema. Arch. Derm. Res., 2015, 307 (7): 617-623; Tsukahara H., Shibata R., Ohta N. et al. High levels of urinary pentosidine, an advanced glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis: relationship with oxidative stress. Metabolism: Clinical and Experimental, 2003, 52 (12): 1601-1605]. Показано, что фермент-антиоксидант, гемоксигеназа, замедляет развитие АД у людей, в том числе и экспериментальный АД у мышей [Kirino M., Kirino Y., Takeno M. et al. Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: implications for human disease. J. Allergy Clin. Immunol., 2008, 122 (2): 290. e8 - 297. e8].

Лечение АД часто является большой проблемой и это вынуждает искать новые терапевтические подходы. Традиционной основой лечения АД, особенно при обострениях, являются топические глюкокортикостероиды (ГКС) и, более редко, топические ингибиторы кальциневрина, нестероидные средства с противовоспалительным и иммуносупрессивным действием. Однако длительное применение топических ГКС может приводить к подавлению функции коры надпочечников и развитию атрофии кожи вследствие подавления синтеза коллагена и задержки пролиферации фибробластов.

Терапия с использованием системных кортикостероидов показана только при тяжелых случаях (псориаз), но и в этом случае их использование должно быть ограничено во времени из-за возможных побочных эффектов. Кортикостероиды индуцируют лизис некоторых подтипов Т-клеток и блокируют также транскрипцию генов IL-1, IL-6 TNF $\alpha$  в макрофагах. Наиболее известные системные средства для подавления воспаления: преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, метотрексат. Другие препараты из этого класса, особенно иммунодепрессанты (известны более 30 препаратов), имеют еще большие ограничения к регулярному использованию. К ним можно отнести циклоспорин (Сандимун), интерферон-гамма, Целлсепт, тазатиоприн (Имуран) и ряд других [J. Am. Acad. Dermatol., 2005; 52: 156; J Am Acad Dermatol. 2004; 50: 391-404]. Циклоспорин блокирует транскрипцию генов цитокинов IL-2, IL-4, IFN- $\alpha$  и IL-2R, тем самым ингибирует и продукцию самих цитокинов, которые вызывают индукцию, активацию и дифференцировку Т-клеток, элементов воспалительной реакции. Применение этих препаратов вызывает при длительном применении лекарственную устойчивость, и разнообразные побочные эффекты с осложнениями.

Установлено, что у больных АД значительно изменяется профиль уринарных маркеров окислительного стресса, включая повышение уровней 8-гидроксидезоксигуанидина, нитрит/нитратов, селена, предполагая ухудшение гомеостаза редокс-системы. Причиной его возникновения, помимо генетических факторов, могут быть ксенобиотики: окислы азота, формальдегид, пылевые наночастицы, автомобильные выхлопы, сигаретный дым, ультрафиолетовое облучение. При превышении защитного порога редокс-системы кожи может нарушиться ее гомеостаз с запуском воспалительного процесса типа АД. Окислительный стресс индуцирует сложную совокупность сигнальных событий (Xu Y., Shao Y., Voorhees J.J., Fisher G.J. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase k by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. J. Biol. Chem., 2006, 281: 27389-27397), которые, в частности, приводят к повышенной продукции матриксных металлопротеиназ, разрушающие коллагеновый внеклеточный матрикс дермы. В этой связи, роль антиоксидантов может оказаться решающей в контроле развития

АД. Показано, что антиоксидантная терапия с заметно улучшает состояние кожи у пациентов с АД с мягкой и средней симптоматикой в двойных-слепых рандомизированных и плацебо-контролируемых испытаниях [Jaffray F., Faghihi G., Mokhtarian A., Hosseini S.M. Effects of oral vitamin E on treatment of atopic dermatitis: A randomized controlled trial. *J. Res. Med. Sci.*, 2015, 20 (11): 1053-1057]. [Kirino M., Kirino Y., Takeno M. et al. Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: implications for human disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, 122 (2): 290. e8 - 297. e8].

Как сильнейший акцептор электронов, фуллерен  $C_{60}$  проявляет высокую антиоксидантную активность и способен эффективно инактивировать все формы АФК и свободные радикалы *in vivo* [Krustic P.J., Wasserman E., Keizer P.N. Radical reactions of  $C_{60}$ . *Science*, 1991, 254: 1183-1185; Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. [60] Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters*, 2005, 5 (12): 2578-2585]. Такая активность предполагает, что фуллерен является перспективным терапевтическим средством для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Показана значительная противовоспалительная активность различных форм  $C_{60}$  (фуллеренола, катионных аминокислотных производных  $C_{60}$  на модели аллергии 4-го типа (гиперчувствительности замедленного типа, ГЗТ) [Dragojevic-Simic V., Jacevic V., Dobric S. et al. Anti-inflammatory activity of fulleranol  $C_{60}(OH)_{24}$  nanoparticles in a model of acute inflammation in rats. *Digest J. Nanomater. Biostr.*, 2011, 6 (2): 819-827; Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Изучение модулирующей активности производных фуллерена  $C_{60}$  на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. *Физиология и патология иммунной системы*, 2012, №2, 17-27]. Полигидроксифуллерен ( $C_{60}(OH)_n$ ) и N-этилполиаминофуллерен ( $C_{60}(NHCH_2CH_3)_n$ ) ингибировали *in vitro* IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток, секрецию цитокинов, гистамина и простагландинов в ответ на стимуляцию аллергеном [Magoulas G.E., Garnelis T., Athanassopoulos C.M et al. Synthesis and anti-oxidative/anti-inflammatory activity of novel fullerene-polyamine conjugates. *Tetrahedron*, 2012, 68 (35): 7041-7049].

Известно изобретение (US 7947262 B2), где водорастворимый  $C_{40}$ ,  $C_{50}$ ,  $C_{60}$  или  $C_{70}$  фуллерен, модифицированный ковалентным присоединением одного или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из пиридина, гидроксила, циклодекстрина, поливинилпирролидона, бис-(моносукцинимид-, p, p'-бис (2-амино-этил) дифенила, полиаминов и N-этилполиаминов, предполагают применять для лечения заболеваний, опосредованных реакцией тучных клеток и базофилов периферической крови в ответ на аллерген. Заявлен очень широкий спектр заболеваний от аллергии до сердечнососудистых. Немодифицированный фуллерен  $C_{60}$  не применяли для этих целей.

Известно изобретение (WO 2009145982), где для лечения поврежденной кожи заявлены соединения различных классов с антиоксидантными свойствами, включая липофильные катионы, нацеленные на транспорт в митохондрии, кератиноциты и фибробласты кожи. В качестве антиоксидантов также применяются витамин E, аскорбиновая кислота, липоевые кислоты, ацетил-цистеин и другие классы веществ, включая химические производные фуллерена.

Известно изобретение (US 20110251158), где соединения фуллерена заявлены как противовоспалительные препараты для лечения атеросклероза сосудов. В патенте заявлен широкий ряд производных фуллерена  $C_{60}$  с формулой  $Zm-F-Y_n$ , где F - фуллерен.

Однако немодифицированный фуллерен C<sub>60</sub> не заявлен для этих целей.

Описаны композиции, предназначенная для сглаживания морщин и улучшения состояния кожи (WO 200913426 A1), представляющая собой раствор фуллеренов C<sub>32</sub>, C<sub>44</sub>, C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>76</sub>, C<sub>90</sub>, C<sub>96</sub> и др. в масле.

Описаны средства для лечения воспалительных заболеваний (US 8680125 B2), представляющие собой химически модифицированные фуллерены, состоящие из фуллерена C<sub>70</sub>, к которому полиприсоединены: гликолевая кислота, инозит, фенилпропионовая кислота, триазол, амид малоновой кислоты. Однако, немодифицированный фуллерен C<sub>60</sub> не заявлен для этих целей.

Описан метод лечения кожного зуда (патент WO 2009114087), где действующими компонентами являются производные фуллерена с формулой C<sub>p</sub> or X@C<sub>p</sub>, где фуллерен имеет заместители; C<sub>p</sub> является фуллереном с числом p углеродных атомов (от 60 до 200), а X@C<sub>p</sub> является эндофуллереном с группой X (металл) внутри полости фуллерена. Немодифицированный фуллерен C<sub>60</sub> не заявлен для указанных целей.

Описана композиция, содержащая солюбилизированный фуллерен в качестве компонента косметических средств (JP 2005060380). Фуллерен C<sub>60</sub> или C<sub>70</sub> солюбилизирован в воде или водных средах с помощью акриловой кислоты, сложных эфиров акриловой кислоты, гомополимеров.

Известна антиоксидантная композиция, предназначенная для косметических продуктов только для внешнего применения, содержащая кислородные производные фуллерена C<sub>60</sub> и C<sub>70</sub> и фуллерены в клатратной форме (с циклодекстрином, краун-эфиром, органическим полимером)) (US 20060134095 A1), а также включенные компоненты с антиоксидантной активностью (например, СОД, триптофан, кверцетин, полифенол и т.п.).

Известен метод (патент US 20110021630 A1) для лечения раневых поражений с помощью использования композиций, описанных в патенте WO 2009114087.

Известно изобретение (WO 2006053839 A1), предназначенное для использования в области парфюмерных изделий, косметических и/или дерматологических средств, где действующим компонентом является производные фуллерена общей формулой F(X)<sub>m</sub> (-Y-Z)<sub>n</sub> и их соли (где F - фуллерен; X=-OH, -NH<sub>2</sub>, COO, -SO<sub>3</sub>, -PO<sub>3</sub>, -O-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, H<sup>+</sup> и др.; Y=AB, где A: CH<sub>2</sub>-, -O-, -S-, -NHCONH-, или -NHCO-, а B: R-O [Si(Me)<sub>2</sub>-O-, -алкил (двухвалентный радикал), C<sub>6-40</sub> арил(двухвалентный радикал), C<sub>7-60</sub> арил или алкил алкиларил (двухвалентный радикал) и т.д. Z=CD, где C=R, R-Ar, Ar или Ar-R). Цель изобретения состоит в увеличении стабильности при хранении, повышении устойчивости к окислению и уменьшению аллергических эффектов парфюмерных изделий.

Описан способ получения фармацевтических композиций на основе производных фуллерена с формулой C<sub>60</sub>(H)<sub>3</sub>{NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH}<sub>3</sub>·xH<sub>2</sub>O, где C<sub>60</sub> - фуллерен, n=5, 6, 7, x=8-10 (патент WO 2012105873 A1), обладающих активностью против вируса герпеса, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противоопухолевой и противовоспалительной активностью.

Описаны композиции для применения в качестве лекарственных средств для лечения кожных заболеваний или опухолей при радиочастотном или микроволновом облучении (CN 103191427 A). Действующий компонент полимерные производные фуллерена: фуллерен-полиэтиленмин, фуллерен-полиэтиленгликоль фуллерен-гиалуроновая

кислота. Немодифицированный фуллерен C<sub>60</sub> не заявлен для указанных целей.

Наиболее близкой по совокупности существенных признаков к заявляемой является косметическая композиция, включающая фуллерен, связанный с порфирином или водорастворимыми полимерами, поливинилпирролидоном, ПЭГ, полипропиленгликолем, сополимерами винилпирролидона (WO 2006001784 A1 - Cosmetic composition containing fullerene clusters). Композиция предлагается для предотвращения или снижения процессов окисления и повреждения здоровой кожи в коже под действием свободных радикалов.

Однако в указанном изобретении фуллерен для перевода в растворимую форму вначале растворяют в токсичных растворителях, бензоле или толуоле, а затем получают в комплекс с полимером. Авторы указывают, что в альтернативной форме, кристаллы фуллерена просто измельчают и вводят в композицию, однако в такой форме фуллерен биологически малодоступен из-за полной его нерастворимости в водной (биологической) среде.

Задача заявляемого нами изобретения заключается в создании мазевой композиции, содержащей нестероидное действующее вещество, фуллерен в водорастворимой форме, обладающей лечебным эффектом в отношении атопического дерматита. Ниже приводится подробное описание получения и использование лекарственного средства.

Техническим результатом заявленного изобретения является снижение воспалительной лейкоцитарной инфильтрации эпидермиса, связанное с лечебным эффектом мази.

Для получения композиции используется свежеприготовленный водный раствор фуллерена (ВРФ), полученный способом, описанным в патенте RU 2548971. В качестве основы для получения мази применяется нетоксичные компоненты - вазелин и пальмитат сахарозы (эмульгатор и стабилизатор композиции), а в качестве консервантов - парабены. При использовании оптимальных соотношений указанных компонентов изготавливаемая мазь имеет гомогенную структуру молочного цвета без запаха и легко наносится на кожу (рис. 1). рН мази находится в пределах 6-6,5. Соотношение компонентов оказывает сильное влияние на ее реологические свойства, динамическую вязкость, стабильность и аппликационную способность.

Терапевтический эффект мази оценивали путем измерения сывороточной концентрации IgE-антител, концентрации цитокинов, экспрессии генов филагрина (FLG), ИЛ-13, Foxp3 и TNF $\alpha$ , а также гистологическим анализом образцов кожи. Уровень специфических IgE в сыворотке крови являлся одним из основных показателей интенсивности развития у мышей аллергенного ответа. Его снижение, как видно на рис. 3, указывает на наличие противоаллергического эффекта у препарата мази. Установлено, что уровень ИЛ-4 в супернатантах стимулированных спленоцитов мышей, получавших фуллерен был заметно ниже относительно модели АД. Похожая картина наблюдалась при определении уровня ИЛ-5 и ИЛ-13 в супернатантах ОА-стимулированных спленоцитов мышей. Явное снижение этих уровней наблюдалось только в группе «С60 20 (20 мкг/мышь). Тенденция к увеличению ИФН- $\gamma$  и ИЛ-12 наблюдалась у мышей, получавших фуллерен C<sub>60</sub> в дозе 20 мкг/мышь, что свидетельствует об изменении поляризации иммунного ответа с Th2 (аллергенный) на Th1. Анализ маркера регуляторных клеток, FoxP3, направленных на снижение аллергического ответа через экспрессию ИЛ-10, показывал нарастание этой продукции. Увеличение Foxp3 может свидетельствовать о повышении численности регуляторных клеток, что может вести к развитию ремиссии аллергического заболевания. Способность фуллерена влиять на экспрессию этого маркера может рассматриваться как ключевой

момент в механизме его терапевтического действия. То же можно отнести и к стимуляции экспрессии филагрина (>2 раза), важного защитного компонента кожи, при воздействии фуллерена (рис. 4). Таким образом, нанесение мази с фуллереном в дозе 20 мкг C<sub>60</sub>/мышь приводит к ощутимому снижению аллергического иммунного ответа.

5 Проведение гистологического микроскопического осмотра срезов кожи (рис. 5-7) подтверждало выводы иммунохимического анализа. Процесс регенерации отчетливо наблюдается при сравнении рисунков 5 (модель АД) и 6 (после обработки воспаленной кожи мазью с фуллереном). Визуально изображение среза кожи на рис.6 очень похоже на изображение среза кожи на рис. 7, взятой с интактного участка.

10 Патоморфологическое исследование кожи также выявило резительный контраст в деталях между образцом «модель АД» (рис. 5) и обработанной мазью образцом (рис. 6). В первом случае выявлялась выраженная воспалительная инфильтрация эпидермиса и дермы лейкоцитами, в том числе и эозинофилами, с некротизированными участками и струпами из кератиновых масс. Во втором случае (рис. 6) наблюдалось явное  
15 уменьшение некротизации и снижение воспалительной лейкоцитарной инфильтрации, очевидно связанное с лечебным эффектом мази. Следует отметить, площадь воспаленного участка кожи составляла около 6 см<sup>2</sup> и при этом оптимальная доза по действующему веществу, фуллерену C<sub>60</sub>, составляла 20 мкг. Другие применяемые дозы  
20 давали худший результат. Исходя из этих цифр, оптимальная доза на 1 см<sup>2</sup> воспаленной кожи составляет 3-4 мкг, или 66 мг мази/см<sup>2</sup> кожи при содержании 50 мкг C<sub>60</sub>/г мази.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Образец композиции (мазь) по примеру 1.

25 Фиг. 2. Фото образца мази, нанесенного на стеклянную пластинку, под микроскопом (подсветка снизу вверх). Увеличение x140.

Фиг. 3. Уровни сывороточных анти-ОА IgE антител.

Фиг. 4. Оценка иммунологических изменений у мышей с экспериментальным АД после обработки мазью, содержащей фуллерен (20 мкг/мышь).

30 Фиг. 5. Гистологическое исследование: образец «модель АД».

Фиг. 6. Гистологическое исследование: образец кожи после терапии мазью

Фиг.7. Гистологическое исследование: образец интактной кожи.

Пример 1. Получение композиции

35 Водный раствор фуллерена, ВРФ, смешивали с вазелином в качестве основы, и затем добавляют пальмитат сахарозы, нипазол и нипагин в весовом соотношении 4:3,78:2,2:0,001:0,001, соответственно пальмитат сахарозы (эмульгатор и стабилизатор композиции) в соотношении 4:3:2 (весовые), соответственно. Полученную смесь энергично перемешивали на гомогенизаторе ULTRA-TURRAX T25 digital (до 25000 об/мин, IKA) без нагревания в течение 20 мин, контролируя температуру (не выше 40°C). После  
40 гомогенизации отбирают пробы на анализ на посторонние включения путем микроскопии (биологический микроскоп, снабженный окулярным микрометром МОБ-1 при увеличении окуляра 15x и объектива 8x), а внешний вид образцов оценивался визуально при дневном освещении, цветность определяли в отраженном свете на белом фоне. Значение рН измеряли при комнатной температуре с помощью рН-метра SevenEasy (Mettler Toledo). Для анализа динамической вязкости применяли ротационный  
45 вискозиметр Brookfield RVDV2T. Анализ содержания фуллерена C<sub>60</sub> проводили спектрофотометрически, предварительно экстрагируя фуллерен, при 340 нм (мол. экстинкция 50200). Полученные значения мази: рН 6.1, вязкость 11.3 пз, содержание

фуллерена 52 мкг/г, без запаха, цвет молочный с кремовым оттенком (рис. 1).

Однородность мазей определяют микроскопически (рис. 2).

Аналогичным способом были получены образцы мазей с различной концентрацией фуллерена путем изменения вносимой доли раствора фуллерена, ВРФ. Таким образом  
5 получены образцы мази с содержанием  $C_{60}$ : от 20 до 120 мкг/г Аналогичным способом  
были получены образцы мазей с различной концентрацией фуллерена путем изменения  
концентрации фуллерена во вносимом в композицию растворе ВРФ (более  
концентрированные растворы ВРФ получают путем упаривания его в вакууме). Таким  
образом получены образцы мази с содержанием  $C_{60}$ : от 50 до 120 мкг/г (0.005-0.012%).

10 Пример 2. Мазь

	Состав мази, % (вес.):
Фуллерен $C_{60}$	0.005
Вода	40.0
15 Пальмитат сахарозы	21.795
Вазелин	37.75
Нипазол	0.1
10 Нипагин	0.1

Пример 3. Моделирование АД и способ терапевтического воздействия

20 Сенсibilизацию мышей проводили модельным аллергеном овальбумином (Sigma).  
На предварительно выбритый участок спины мышей накладывали стерильную марлю  
размером 1x1 см, пропитанную 0,1% раствором ОА, закрепляя ее специальным  
материалом (Bioclusive, Johnson and Johnson Medical Limited), который предохраняет от  
высыхания. Площадь кожи, подвергшейся сенсibilизации ОА, составляла ~6 см<sup>2</sup>.  
25 Аллерген наносили на 7 дней, после чего повязки снимали. Через две недели 7-дневную  
аппликацию 0,1% ОА повторяли еще два раза с двухнедельным интервалом (группа  
АД-модель). Учет результатов проводили в конце периода третьей аппликации.  
Отрицательным контролем являлись мыши, эпидермально получавшие вместо ОА  
фосфатно-солевой буфер (ФСБ).

30 Нанесение мази на поврежденные участки кожи с концентрацией фуллерена 20 мкг/  
мышь («С60 20 мазь») осуществлялись 5 раз через 2-недельные интервалы.

Анализ уровня специфических антител и цитокинов

Уровни специфических IgE антител в индивидуальных сыворотках крови мышей  
тестировались согласно инструкции производителя («BD», США). Для сорбции  
35 использовали ОА (10 мкг/мл) в ФСБ. Количественное определение цитокинов в  
супернатантах стимулированных спленоцитов проводили методом ИФА с  
использованием наборов фирмы BD OptEIA™ (США) в соответствии с методическими  
рекомендациями производителя. Концентрацию цитокинов определяли по  
калибровочной кривой, полученной при титровании входящих в состав наборов  
40 стандартных образцов интерлейкинов мыши. Результаты представлены на рис. 3 (анализ  
IgE-антител) и в качественном отношении на рис. 4.

Анализ экспрессии цитокинов ИЛ-13, Foxp3, FLG и TNF $\alpha$

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реактивов  
Синтол (Россия). Учет и анализ результатов проводили при помощи программного  
45 обеспечения к прибору IQ5 Bio-Rad согласно инструкциям производителя. Образцы  
кДНК нормировали по гену mHPRT. Результаты представлены на фиг. 4.

Гистологический анализ

Образцы иссеченной кожи фиксировали в 10% растворе забуференного формалина

(рН 6,8-7,2). Обезвоживание, проводку образцов и пропитывание парафином производили в гистопроцессоре автоматического типа SLEE MAINZ (Германия), заливку в парафин проводили с использованием заливочной станции SLEE MAINZ (Германия). Микротомирование парафиновых блоков для получения срезов толщиной 4 мкм  
5 осуществляли с помощью автоматизированного ротационного микротома Finesse E+ (Финляндия), окрашенные по общепринятой методике гематоксилином и эозином гистологические срезы заключали в монтирующую среду под покровные стекла для получения постоянных микропрепаратов. Микроскопический анализ гистологических препаратов кожи мышей разных групп и фотографирование проводили на микроскопе  
10 Leica DM2000 с камерой DFC295 (Leica, Германия).

(57) Формула изобретения

Композиция для терапии атопического дерматита в форме мази, включающая: водный раствор фуллерена C<sub>60</sub>, вазелин, пальмитат сахарозы, а также парабены -  
15 нипазол и нипагин в весовом соотношении 4:3,78:2,2:0,001:0,001, при этом конечное содержание фуллерена в композиции составляет от 0,005 до 0,012 мас. %.

20

25

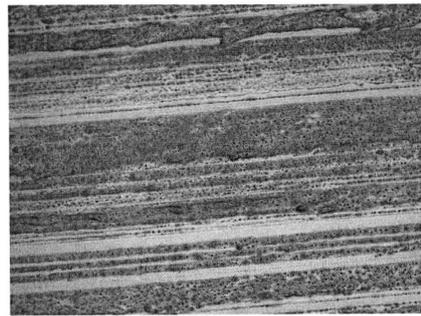
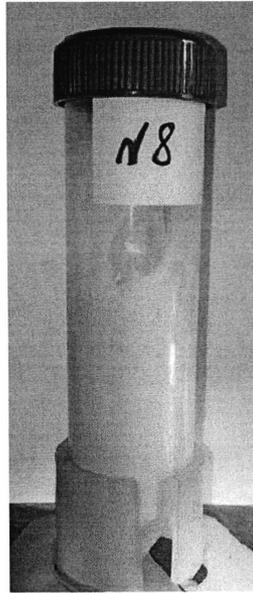
30

35

40

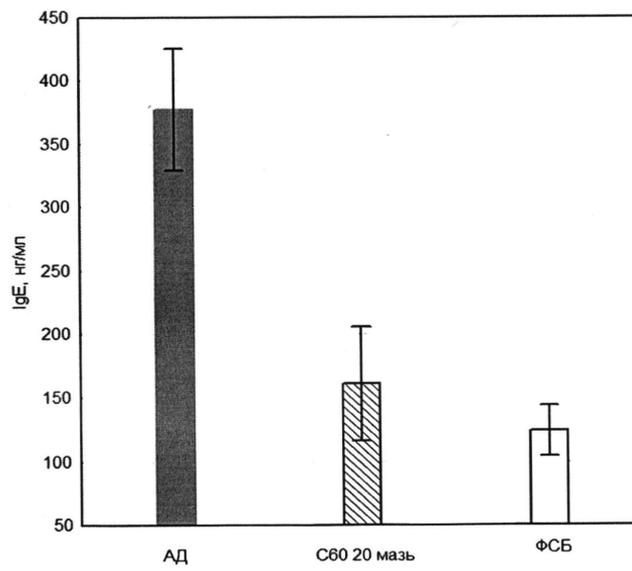
45

1



Фиг. 1

Фиг. 2



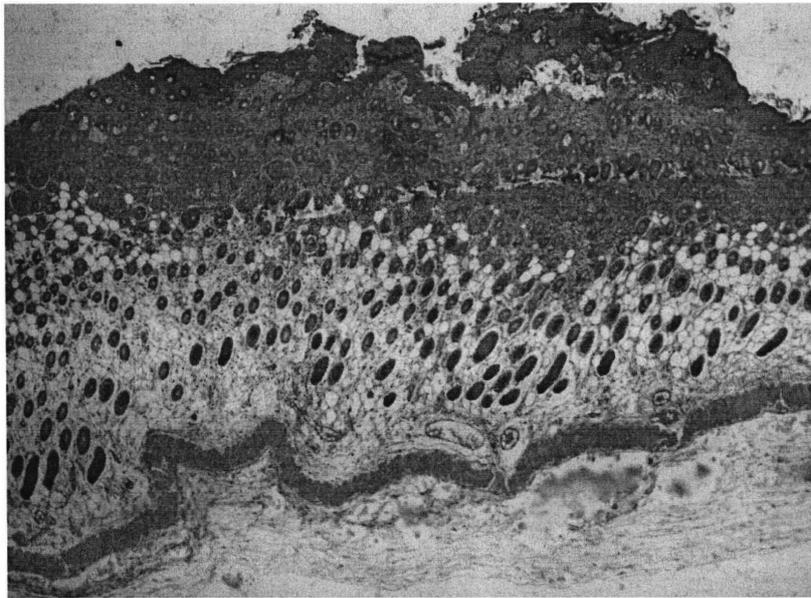
Фиг. 3

2

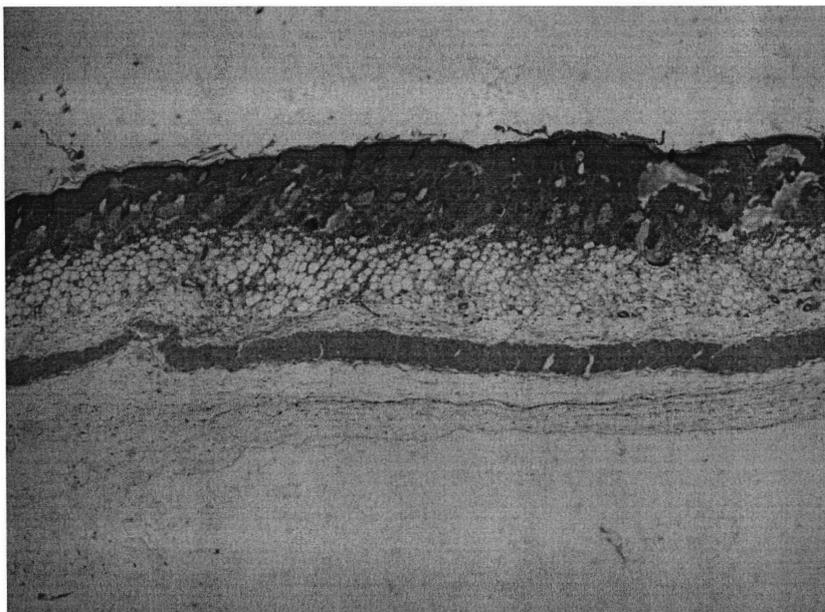
Анализируемый показатель	Направление эффекта после обработки воспаленной кожи (АД)
Специфический IgE	↓
ИЛ-4	↓
ИЛ-5	↓
ИЛ-12	↑
ИФН-γ	↑
FLG	↑

Анализируемый показатель	Доза аппликации фуллерена C <sub>60</sub> , мкг/мышь	
	0 (модель АД)	20 (мазь)
Специфический IgE	+++	+
ИЛ-4	+++	+
ИЛ-5	+++	++
ИЛ-13	+++	+
ИЛ-12	+	++
ИФН-γ	+	+
ИЛ-10	+	+
Foxp3	+	++
ИЛ-17A	+	+

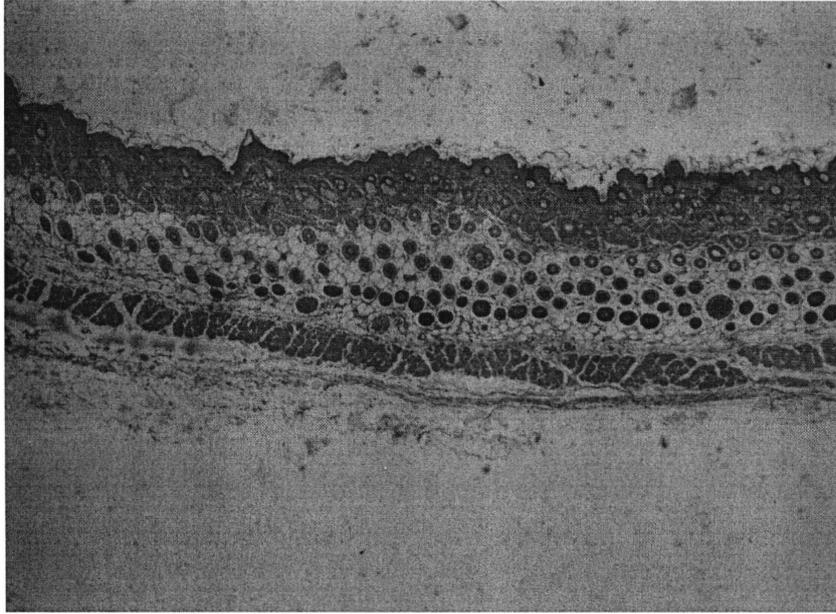
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7