



(51) МПК
A61K 35/26 (2015.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/26 (2022.01); C07K 14/47 (2022.01); C07K 14/52 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2021103158, 10.02.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 10.02.2021

Дата регистрации:
 15.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.02.2021

(45) Опубликовано: 15.03.2022 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

107078, Москва, Красноворотский пр-д, 3, 1,
 IV-18, ООО "ППФ "ИСКОНА-II",
 ГАВРИЛОВА ЕЛЕНА АРКАДЬЕВНА

(72) Автор(ы):

Зайцев Игорь Закванович (RU),
 Викслер Виктор (DE),
 Никонова Татьяна Геннадьевна (BY),
 Полетаева Нина Николаевна (RU),
 Скрыбин Борис Владимирович (DE),
 Ручьев Александр Валерьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Зайцев Игорь Закванович (RU),
 Ручьев Александр Валерьевич (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CN 106166291 В, 30.06.2020. Е.Г. Кузнецова, В.А. Рыжикова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов "ТРАНСДЕРМАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И СПОСОБЫ ЕГО УСИЛЕНИЯ", Вестник трансплантологии и искусственных органов, том XVIII N 2, 2016, С.152-162, DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-152-162. ЕА 33742 В1, 21.11.2019. ЕА 32439 В9, 30.08.2019. DE 3633651 (см. прод.)

(54) Пептидный толерогенный компаунд

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии и раскрывает противовоспалительный препарат на основе пептидов селезенки млекопитающих, при этом препарат представлен в форме кожного водно-спиртового лосьона системного противовоспалительного действия, содержащий фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа в количестве 1-5 мас. % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас. %, хлористый натрий в количестве 0-0,5 мас. %, хлористый цинк в количестве 0-0,05 мас. %, сульфат кальция в количестве 0-0,2 мас. %, вода – остальное, при pH 7,4±0,2. Также группа изобретений относится к способу подавления

воспалительной реакции и к применению противовоспалительного препарата. Техническим результатом группы изобретений является достижение противовоспалительного терапевтического эффекта на фоне перманентной принудительной суперэкспрессии наиболее мощного провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (ФНО-альфа - TNFα), т.е. препарат по изобретению обеспечивает не только противовоспалительный эффект, но и проявляет толерогенное действие - инициирует специфическую толерантность Т-регуляторных клеток к собственным антигенам организма, что обуславливает его эффективность в терапии аутоиммунных воспалительных заболеваний; более эффективная стимуляция незрелых (naïve)

моноцитов к выработке Treg, по сравнению с цитокинами GM-CSF+M-CSF, которые используются в классической методике индуцирования Treg и могут присутствовать в пептидных фракциях из селезенки с молекулярной массой более 12 кДа, а именно около 30 кДа для GM-CSF и около 60 кДа для M-CSF, но отсутствуют в предложенном препарате на основе фракции пептидов из селезенки с молекулярной массой не более 12 кДа; достижение системного противовоспалительного терапевтического действия при использовании препарата в форме водно-спиртового лосьона при нанесении его на кожу, что вызывает снижение концентрации провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-2

в крови; предупреждение развития псориатического и ревматоидного артрита с эффективностью около 70% за счет системного толерогенного противовоспалительного терапевтического действия; достижение толерогенного противовоспалительного терапевтического эффекта в пригодной для возможности внебольничного индивидуального применения форме; достижение системного толерогенного противовоспалительного терапевтического действия без проявления нежелательных побочных эффектов – аллергических реакций и подавления адаптивного иммунитета. 3 н. и 11 з.п. ф-лы, 2 табл., 8 пр., 10 ил.

(56) (продолжение):

A1, 14.04.1988. CN 106110292 A, 16.11.2016. CN 102125517 B, 11.12.2013. RU 2152219 C1, 10.07.2000. RU 2496786 C2, 27.10.2013.

R U 2 7 6 6 3 4 0 C 1

R U 2 7 6 6 3 4 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 35/26 (2022.01); C07K 14/47 (2022.01); C07K 14/52 (2022.01)

(21)(22) Application: 2021103158, 10.02.2021

(24) Effective date for property rights:
10.02.2021Registration date:
15.03.2022

Priority:

(22) Date of filing: 10.02.2021

(45) Date of publication: 15.03.2022 Bull. № 8

Mail address:

107078, Moskva, Krasnovorotskij pr-d, 3, 1, IV-18,
OOO "PPF "ISKONA-II", GAVRILOVA ELENA
ARKADEVNA

(72) Inventor(s):

Zajtsev Igor Zakvanovich (RU),
Viksler Viktor (DE),
Nikonova Tatyana Gennadevna (BY),
Poletaeva Nina Nikolaevna (RU),
Skryabin Boris Vladimirovich (DE),
Ruchev Aleksandr Valerevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Zajtsev Igor Zakvanovich (RU),
Ruchev Aleksandr Valerevich (RU)

(54) PEPTIDE TOLEROGENIC COMPOUND

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology and discloses an anti-inflammatory preparation based on mammalian spleen peptides, wherein the preparation is presented in the form of a dermal water-alcohol lotion of systemic anti-inflammatory action, containing a fraction of purified peptides of spleen of mammals with molecular weight of not more than 12 kDa in amount of 1÷5 wt. % to the total weight of the composition, 96 % ethanol in amount of 40 wt. %, sodium chloride in amount of 0–0.5 wt. %, zinc chloride in amount of 0–0.05 wt. %, calcium sulphate in amount of 0–0.2 wt. %, water is the rest, at pH 7.4 ± 0.2. Group of inventions also relates to a method of suppressing the inflammatory response and to the use of an anti-inflammatory preparation.

EFFECT: achieving anti-inflammatory therapeutic effect with underlying permanent forced overexpression of the most powerful pro-inflammatory cytokine - tumour necrosis factor (TNF-alpha - TNFα), that is, the preparation according to the invention provides not only an anti-inflammatory effect, but also exhibits

tolerogenic action - initiates specific tolerance of T-regulatory cells to body own antigens, which causes its effectiveness in therapy of autoimmune inflammatory diseases; more effective stimulation of immature (naive) monocytes to Treg production, compared to cytokines GM-CSF + M-CSF, which are used in the classical Treg induction technique and can be present in peptide fractions from the spleen with molecular weight of more than 12 kDa, specifically about 30 kDa for GM-CSF and about 60 kDa for M-CSF, but are absent in the disclosed preparation based on the spleen peptide fraction with molecular weight of not more than 12 kDa; achieving systemic anti-inflammatory therapeutic action when using the preparation in the form of a water-alcohol lotion when applied to the skin, which causes a decrease in the concentration of pro-inflammatory cytokines TNFα, IL-1b and IL-2 in the blood; prevention of development of psoriatic and rheumatoid arthritis with efficiency of about 70 % due to systemic tolerogenic anti-inflammatory therapeutic action; achieving a tolerogenic anti-inflammatory therapeutic effect in a form suitable for out-of-hospital use; achieving systemic tolerogenic anti-inflammatory

therapeutic action without undesirable side effects -
allergic reactions and suppression of adaptive immunity.

14 cl, 2 tbl, 8 ex, 10 dwg

R U 2 7 6 6 3 4 0 C 1

R U 2 7 6 6 3 4 0 C 1

Предложенное изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению противовоспалительного средства на основе биологически активной пептидной фракции из селезенки млекопитающих. Препарат в форме водно-спиртового лосьона может быть использован в медицине и ветеринарии в качестве противовоспалительного средства для предупреждения развития воспаления при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях.

Разработан способ получения уникального состава противовоспалительного препарата, обладающего следующими характеристиками:

Лекарственная форма: водно-спиртовой раствор очищенных пептидов селезенки млекопитающих в диапазоне молекулярных масс до 12 кДа с концентрацией не менее 1% (лосьон) для кожного применения. Лечебный лосьон получают по оригинальной технологии, допускающей неограниченное масштабирование за счет исключения критических процессно-аппаратных приемов, а именно – ацетона, хроматографии, диализа, лиофилизации и ультрафильтрации. Эффективность поглощения пептидов интактной кожи человека около 60% в присутствии 40%-го этанола впервые продемонстрирована *in vivo* с помощью хроматографического анализа остаточного материала на коже.

Физиологическое действие: очищенные пептиды не более 12 кДа из селезенки млекопитающих в присутствии этанола проникают сквозь кератиновый слой кожи 10-15 мкм, достигают следующего базального слоя с расположенными в нем клетками Лангерганса (первичная биологическая мишень) и направляют дифференцировку клеток Лангерганса по толерогенному способу, которые далее мигрируют в лимфоузлы и инициируют специфическую толерантность Т-регуляторных клеток к собственным антигенам организма, что обеспечивает проявление противовоспалительного эффекта.

Физиологическое действие пептидов селезенки впервые расшифровано с помощью генно-модифицированной модели мышей *in vivo* с принудительной экспрессией фактора некроза опухолей (ФНО-альфа) и в опытах со смешанными культурами дендритных клеток, Т-лимфоцитов и незрелых (naïve) моноцитов *in vitro*.

При кожной аппликации предложенного препарата пептиды селезенки запускают системный терапевтический процесс с достижением толерогенного противовоспалительного действия, что продемонстрировано *in vivo* на млекопитающих с ревматоидным артритом (собаки) и псориатическим артритом (мыши).

Предшествующий уровень техники

Известные противовоспалительные средства

Противовоспалительные и иммуносупрессивные средства, такие как глюкокортикостероиды, НПВП, цитостатики и специфические противовоспалительные моноклональные антитела являются симптоматическими средствами, т.е. они не излечивают заболевание, но только смягчают его проявление.

Длительное применение всех описанных лекарственных средств сопровождается побочными явлениями, которые со временем становятся часто более угрожающими, чем сами заболевания. В последнее время надежду дают противовоспалительные моноклональные антитела, но и они имеют серьезные побочные явления, нарастающие со временем - аллергические реакции, гриппоподобный синдром (повышение температуры, недомогание, боли в мышцах), тошнота, диарея и другие диспептические нарушения, уменьшение количества клеток крови — тромбоцитов, лейкоцитов, эритроцитов, а также кардиотоксическое действие. К тому же высокая стоимость препаратов моноклональных антител делает их практически недоступными для массового использования.

Негормональные противовоспалительные препараты – НПВП, такие как аспирин, ибупрофен, парацетамол и другие обладают умеренными побочными явлениями, в основном поражают ЖКТ (НПВС-гастропатия), но слабой эффективностью. При наружном применении могут вызывать раздражение кожных покровов в виде покраснения, отека, высыпаний или зуда; при длительном применении — системные побочные реакции.

Глюкокортикостероидные препараты – природные гормоны надпочечников или синтетические аналоги противовоспалительных гормонов, такие как кортизол, гидрокортизон, преднизолон, дексаметазон и другие имеют сильное противовоспалительное действие, но подавляют иммунитет и обладают тяжелыми, зачастую необратимыми побочными явлениями при длительном приеме. Системные побочные эффекты при приеме глюкокортикостероидов проявляются со стороны центральной нервной системы (психозы, депрессия, повышенная нервная возбудимость и другие), со стороны сердечно-сосудистой системы (тромбоэмболии, повышение артериального давления, миокардиодистрофия и другие), со стороны репродуктивной системы (гирсутизм, задержка полового развития и другие), со стороны пищеварительной системы (жировая дистрофия печени, панкреатит, кровотечения из ЖКТ, стероидные язвы кишечника и желудка), со стороны эндокринной системы (сахарный диабет, синдром Кушинга, ожирение, атрофия коры надпочечников вследствие угнетения ее функции) и других систем организма. Также во время терапии глюкокортикостероидными препаратами наблюдаются обострения инфекционно-воспалительных процессов хронической формы.

Цитостатики, например, метотрексат и другие, также обладают сильным специфическим действием и тяжелыми необратимыми побочными явлениями при длительном приеме.

Моноклональные антитела к противовоспалительным цитокинам и/или к их рецепторам, как уже было отмечено выше, обладают сильным специфическим действием, но чрезвычайно дороги и со временем теряют эффективность из-за появления вторичных антител в организме пациента.

Наиболее перспективным источником действующего начала для лечения аутоиммунных и воспалительных заболеваний ранее была определена селезенка млекопитающих. Известен инъекционный препарат "Спленопид", разработанный А.Б.Цыпиным и соавторами в 1998 году [1], получаемый в виде ультрафильтра экстракта селезенки свиньи на мембране с отсечкой 50 кДа, с помощью которого удавалось излечивать ряд аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Известен также более ранний патент В.А.Чернова и соавторов 1993 г. [2], где белково-пептидный комплаунд селезенки КРС в диапазоне 10-140 кДа использовали для лечения чумы плотоядных.

Однако, оба препарата имеют 4 критических недостатка:

(1) В диапазоне до 50 кДа и, тем более, до 140 кДа присутствуют практически все известные эффекторы (цитокины, хемокины, интерфероны) как провоспалительной, так и противовоспалительной природы. По этой причине такие препараты в принципе не могут быть однозначно охарактеризованы и не могут быть причислены к категории лекарственных средств, несмотря на заявленный положительный физиологический эффект.

(2) Оба препарата являются чрезвычайно грязными по своему составу и, кроме потенциальных эффекторных молекул, содержат более 80% балластных компонентов белковой, полинуклеотидной, полисахаридной и иной природы.

(3) Их инъекционное использование недопустимо не только из-за превалирования балласта, но также по той причине, что биополимеры из ксенобиотических органов и тканей свыше 20-30 кДа обладают иммуногенностью для человека, что чревато выработкой аутоиммунных антител (например, для минимизации появления вторичных аутоиммунных антител терапевтические моноклональные антитела специально "гуманизируют"). Авторы обоих патентов не испытывали трансдермальную форму, но с описанным составом трансдермальная форма также опасна возникновением аутоиммунного дерматита после многократного применения.

(4) Оба препарата никоим образом не изучены на молекулярно-клеточном уровне, до сих пор не были известны их биологические мишени.

Более того, в патентной и научно-медицинской литературе авторами не обнаружено ни одного примера, где была бы определена первичная биологическая мишень и расшифрован механизм действия селезеночных и других природных низкомолекулярных пептидов с молекулярным весом меньше 10-12 кДа. Это касается всех известных коммерческих пептидных препаратов из природных источников (Кортексин, Polyerga, Спленид, Сампрост, Тималин, Тактивин, Пиналекс и др.).

Также не обнаружено противовоспалительных средств на основе пептидов селезенки системного противовоспалительного действия в трансдермальной (накожной) лекарственной форме.

Трансдермальная доставка лекарственных веществ

Казалось бы, трансдермальная доставка лекарств теоретически позволяет вводить препарат доступным неинвазивным путем. Благодаря простоте применения и самостоятельному введению, трансдермальная доставка должна характеризоваться контролируемым по скорости высвобождением препарата, уникальным для такого желательного способа [3,4].

Однако, несмотря на впечатляющую широту исследований в данной области [5], рынок терапевтических средств системного действия с использованием пассивного неинвазивного трансдермального переноса до сих пор является минорным.

Вещества, которые могут быть доставлены трансдермально, а именно – никотин, кортикостероиды, скополамин и другие вещества представляют собой небольшие и гидрофобные молекулы. Обход естественных препятствий для того, чтобы обеспечить проникновение лекарства, является заветным шагом к успешной трансдермальной доставке [6]. Поэтому попытки продвинуться в этом направлении продолжают постоянно, а именно, разрабатываются технологии трансдермальной доставки: с использованием наноэмульсии [7], с использованием трансферосом [8], [9], с использованием наночастиц [10], с использованием глипизидного матрикса этилцеллюлозы/поливинилпирролидона и Эудрагита RL-100/Эудрагита RS-100 [11]), с использованием ионофореза [12], с использованием электропорации [13]). Существует способ [14], где в составе накожных средств указан этанол в концентрации от 0.01 до 60%, но в данной заявке рассматриваются только низкомолекулярные вещества до 0.5-0.6 кДа и нет упоминания о пептидах. В целом, несмотря на многочисленные попытки, до настоящего времени в реальной практике не существует способов пассивной глубокой доставки пептидов до слоя васкуляризации.

Единственным эффективным методом чрезкожного введения белковых гормонов и пептидов обладает техника с использованием пластырей с растворимыми микроиглами [15, 16, 17, 18, 19]. Технология нацелена на внебольничное применение, но она выходит за рамки темы неинвазивного пассивного трансдермального введения и является высокотехнологичным развитием инъекционных методов.

Биодоступность и биологическая мишень

Представляется не совсем логичным, что изобретатели трансдермальных способов доставки активных белков и пептидов не ставили перед собой задачу выявления первичной биологической мишени, т.е. эффекторной клетки. Вероятной причиной является тот факт, что под понятием "биодоступность", как правило, понимается способность трансдермального лекарственного препарата достигать капилляров системного кровотока, хотя в некоторых случаях это не является необходимым и достаточным требованием.

Анатомически кожа состоит из трех основных слоев. Самой внешней частью и первой линией защиты от проникновения чужеродных веществ является роговой слой. Этот слой, в основном, состоит из мертвых клеток (кератиноцитов), имеет толщину примерно 10-15 мкм и окружен липидным внеклеточным матриксом [20]. Под роговым слоем находится жизнеспособный эпидермис (суммарно базальный и шиповатый слой), толщина которого составляет примерно 50-100 мкм. Вместе взятые эти три слоя называют полным эпидермисом. Под полным эпидермисом находится первый слой васкуляризации, присутствующий в слое, известном как дерма. Это волокнистый слой, толщиной приблизительно 1-2 мм, состоящий из капиллярных слоев, которые являются местом введения препарата в циркуляцию [21], если препарат способен их достичь. Однако, многократно экспериментально доказано, что кожа не пропускает глубже базального слоя молекулы, превышающие 500 Да [22], особенно это касается молекул гидрофильной природы [23].

Авторы предложенного изобретения поставили задачу выяснить - существуют ли в верхних слоях кожи эффекторные клетки, на которые можно воздействовать в терапевтическом смысле. В коже непосредственно под кератиновым слоем, т.е. в базальном и шиповатом слоях, находятся дендритные клетки (клетки Лангерганса). Важнейшим моментом является то, что клетки Лангерганса не существуют как постоянный эпидермальный класс дендритных клеток. Они мигрируют в эпидермис и обратно в лимфатические узлы, куда транспортируют «захваченные» чужеродные агенты, например, антигены, и представляют их лимфоцитам. Данное положение продемонстрировано в серии фундаментальных работ G.F.Murphy и соавт., выполненных с 1986 года [24], где была показана трансформация дермальных активно фагоцитирующих макрофагов в эпидермальные клетки Лангерганса через промежуточные формы, которые совмещали в себе как свойства моноцитов-макрофагов, так и типичных дендритных клеток.

Именно клетки Лангерганса принимают участие в индукции иммунной толерантности к собственным антигенам кожи, которые высвобождаются при травмах и воспалительных процессах, связывая в единую функциональную систему два органа - кожу и лимфоузлы [25].

На основании анализа указанных данных авторы настоящего изобретения сделали вывод о том, что, если под термином "биодоступность" понимать способность лекарственного вещества достигать биологической мишени, т.е. эффекторной клетки, то среди всех пептидных кандидатов на роль трансдермального противовоспалительного средства с пассивным переносом логично заранее выбирать те, которые напрямую взаимодействуют с клетками Лангерганса.

Методы оценки поглощения пептидов интактной кожей *in vivo*

Известные методы оценки эффективности трансдермальной доставки *in vitro* (более корректно – оценки эффективности кожной абсорбции) позволяют контролировать экспериментальные переменные с помощью простейших протоколов. Предполагается,

что оценки *in vitro* являются важными инструментами для разработки и скрининга рецептур, предсказывающих кожную абсорбцию *in vivo* [26, 27, 28, 29, 30, 31]. Однако, распространение результатов данного подхода, в т.ч. с использованием модификаций ячейки Франца [32], на эффективность переноса пептидов через нетравмированную

5 кожу *in vivo* является спорным.

Для лучшей количественной оценки проникновения веществ внутрь кожи *in vivo* используются методы, практически недоступные для рутинного анализа, а именно: ослабленная инфракрасная спектроскопия полного отражения с Фурье-преобразованием [33, 34] и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (CLSM) как модификация

10 флуоресцентной микроскопии [35, 36, 37].

Обзор методов оценки поглощения лекарств кожей *in vivo* показывает, что это самая методически сложная проблема [38, 39, 40, 41, 42]. При этом используются неоправданно экзотические, в т.ч. микротравмирующие процедуры типа кожного микродиализа, зачищающей липкой ленты, термического воздействия и др., подробно описанные в

15 обзоре [43]. В итоге возникла необходимость разработки собственного оригинального корректного способа оценки.

Получение пептидных препаратов из природных источников

Известны способы получения пептидных лекарственных препаратов, косметических средств и биологически активных добавок из органов и тканей млекопитающих,

20 например: Патент SU 1077089 [44], Патент SU 1112606 [45], Патент SU 1218521 [46], Патент SU 1522485 [47], Патент SU 944191 [48], Патент RU 2104702 [49], Патент CN 1557465A [50].

Общими признаками известных способов получения пептидных препаратов является использование значительного объема ацетона и/или

25 ультрафильтрации и/или хроматографии и/или лиофилизации, что неприемлемо для массового производства в необходимом диапазоне терапевтических курсов, миллионы и более доз препарата.

В качестве ближайшего аналога предлагается противовоспалительный препарат «Спленипид» [1]. Препарат предназначен для в/м введения и представляет собой пептидную фракцию из селезенки КРС или свиней с молекулярной массой 0,4-50 кДа в

30 форме лиофилизата с желатинолом и гентамицином, терапевтический эффект которого показан на грызунах и человеке. «Спленипид» обладает выраженным иммунокорректирующим действием при различных патологиях, связанных с нарушением функций иммунной системы, стимулирует метаболическую и функциональную активность лейкоцитов периферической крови, способствует выведению аутоиммунных

35 комплексов из организма при системной красной волчанке, что связано с повышением активности фагоцитирующих клеток и снижением воспалительной реакции.

Как уже было отмечено выше, «Спленипид» обладает рядом недостатков, из которых выделяются по меньшей мере два наиболее существенных:

- из-за наличия в составе препарата неопределенной смеси биополимеров в диапазоне

40 до 50 кДа, включающей эффекторы как провоспалительной, так и противовоспалительной природы, такой препарат в принципе не может быть однозначно охарактеризован, что не позволяет причислить его к категории лекарственных средств;

- из-за наличия в составе препарата, помимо потенциальных эффекторных молекул, более 80% балластных компонентов белковой, полинуклеотидной, полисахаридной и

45 иной природы из ксенобиотических органов и тканей свыше 20 кДа, многократное инъекционное использование недопустимо, поскольку чревато выработкой аутоиммунных антител.

Предложенное изобретение решает техническую проблему отсутствия эффективного

пептидного противовоспалительного средства в форме трансдермального препарата, который может быть получен простым способом, пригодным для массового производства.

5 Техническая задача состоит в разработке состава терапевтически эффективного пептидного противовоспалительного средства с минимизацией побочных эффектов, пригодного для внебольничного применения, а также способа его получения.

Раскрытие сущности изобретения

10 Авторы предложенного изобретения поставили задачу найти биологически активное вещество или молекулярный компаунд, пригодный к стабильному излечению аутоиммунных и воспалительных состояний без побочных явлений, свойственных глюкокортикостероидам, НПВП, цитостатикам и специфическим противовоспалительным моноклональным антителам.

При этом заранее руководствовались следующими 4-мя ограничениями:

15 1. Активное вещество или молекулярный компаунд должны быть природного происхождения. Это наиболее дешевый и неограниченный источник сырья, что важно для массового производства. Кроме того, синтетические соединения, например пептиды, не учитывают необходимые природные требования, такие как гликозилирование, фосфорилирование, ветвление, образование кольцевых форм, синергидное действие в комплексе (компаунде). Последнее утверждение оправдано тем фактом, что до сих пор
20 не созданы синтетические вещества, стабильно излечивающие аутоиммунные и воспалительные заболевания.

2. В случае пептидов, их молекулярная масса не должна превышать 20 кДа во избежание аутоиммунизации.

3. Лекарственная форма должна быть неинвазивной для возможности внебольничного индивидуального применения. Пероральная форма была исключена из-за неизбежной
25 деградации биомолекул в ЖКТ. Учитывая необходимость доклинических исследований, кандидатную лекарственную форму свели исключительно к трансдермальной (накожной), т.к. ректальную и сублингвальную формы весьма проблематично испытывать на животных.

30 4. Способ получения вещества или молекулярного компаунда должен быть стандартизуемым, экономным, экологически приемлемым и неограниченно масштабируемым ввиду чрезвычайно широкой потребности в желаемом препарате.

В процессе реализации данных задач получен продукт с заданными целевыми свойствами, а также разработана эффективная технология способа его получения и
35 применения.

Технический результат предложенного изобретения состоит в:

- достижении противовоспалительного терапевтического эффекта на фоне перманентной принудительной суперэкспрессии наиболее мощного провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (ФНО-альфа - TNF α), т.е. препарат по
40 изобретению обеспечивает не только противовоспалительный эффект, но и проявляет толерогенное действие - инициирует специфическую толерантность Т-регуляторных клеток к собственным антигенам организма, что обуславливает его эффективность в терапии аутоиммунных воспалительных заболеваний;

- более эффективной стимуляции незрелых (naïve) моноцитов к выработке Treg, по сравнению с цитокинами GM-CSF + M-CSF, которые используются в классической методике индуцирования Treg и могут присутствовать в пептидных фракциях из селезенки с молекулярной массой более 12 кДа, а именно около 30 кДа для GM-CSF и около 60 кДа для M-CSF, но отсутствуют в предложенном препарате на основе фракции пептидов

из селезенки с молекулярной массой не более 12 кДа;

- достижении системного противовоспалительного терапевтического действия при использовании препарата в форме водно-спиртового лосьона при нанесении его на кожу, что вызывает снижение концентрации провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1b и IL-2 в крови;

- предупреждении развития псориатического и ревматоидного артрита с эффективностью около 70% за счет системного толерогенного противовоспалительного терапевтического действия;

- возможности достижения толерогенного противовоспалительного терапевтического эффекта в пригодной для возможности внебольничного индивидуального применения форме;

- возможности достижения системного толерогенного противовоспалительного терапевтического действия без проявления нежелательных побочных эффектов – аллергических реакций и подавления адаптивного иммунитета.

Указанный технический результат достигается за счет разработки авторами настоящего изобретения уникального состава и лечебной формы противовоспалительного препарата.

Предложен противовоспалительный препарат на основе пептидов селезенки млекопитающих, представленный в форме композиции кожного водно-спиртового лосьона системного противовоспалительного действия, содержащий фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа. При этом рабочий диапазон представлен фракцией пептидов с молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 0,4 кДа до 12 кДа.

Фракция очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа представлена в препарате с концентрацией не менее 1%, что обеспечивает эффективное количество активного начала, а именно, 1 ÷ 5 мас % к общей массе композиции.

В состав предложенного препарата также входит 96% этанол в количестве 40 мас % и вода – остальное, при рН 7.4±0.2.

Кроме этого, в составе предложенного препарата могут присутствовать хлористый натрий в количестве 0 - 0,5 мас %, хлористый цинк в количестве 0 - 0,05 мас % и сульфат кальция в количестве 0 - 0,2 мас %.

В наиболее предпочтительном воплощении предложен противовоспалительный препарат на основе пептидов селезенки млекопитающих, представленный в форме композиции кожного водно-спиртового лосьона системного противовоспалительного действия, содержащий фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа в количестве 1 ÷ 5 мас % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас %, хлористый натрий в количестве до 0,5 мас %, хлористый цинк в количестве до 0,05 мас %, сульфат кальция в количестве до 0,2 мас %, вода – остальное, при рН 7.4±0.2.

Предложенный препарат нормализует баланс воспалительных и противовоспалительных реакций, который определяют по нормализации *in vivo* уровня цитокинов ФНО-альфа, IL-1-бета и IL-2, в том числе, при воспалительной ЛПС-провокации.

Кроме этого, предложенный препарат предупреждает развитие аутоиммунных или воспалительных заболеваний, включая псориатический и ревматоидный артрит, что позволяет его использовать в профилактике, терапии или для уменьшения тяжести симптомов указанных заболеваний как у человека, так и у животных.

Соответственно, предложенный водно-спиртовой лосьон может быть представлен в виде препарата, композиции или средства для фармацевтического или ветеринарного применения.

5 Указанный технический результат достигается за счет разработки авторами настоящего изобретения эффективной технологии получения противовоспалительного препарата.

Предложенный способ получения противовоспалительного препарата предусматривает последовательное проведение следующих этапов:

10 смешивания измельченной до состояния фарша селезенки млекопитающего с 0,1% раствором хлористого цинка в соотношении 2 массовых частей раствора на 1 массовую часть фарша,

фиксации крупномолекулярной фракции путем закисления полученного гомогената при интенсивном перемешивании до значения рН $3,0 \pm 0,2$ с помощью 5 М раствора соляной кислоты,

15 экстракции пептидов доведением рН гомогената до значения рН $8,0 \pm 0,2$ с помощью 5 М раствора гидроксида натрия,

получения осветленного экстракта с помощью замораживания-экссудации или проточного центрифугирования,

20 преципитации крупномолекулярного балласта путем добавления в экстракт 5 М раствора серной кислоты до значения рН $2,5 \pm 0,2$ с отсечкой балласта при помощи нутч-фильтра и получения кислого фильтрата,

преципитации сульфата путем нейтрализации фильтрата 30%-й водной взвесью гидроксида кальция до значения рН $7,4 \pm 0,2$ с отсечкой преципитата при помощи нутч-фильтра и получения нейтрального фильтрата,

25 преципитации остаточного балласта и частичного обессоливания путем внесения в фильтрат расчетного объема 96%-го этанола до содержания 40 мас % с отсечкой остаточного белково-солевого осадка при помощи нутч-фильтра и получения композиции кожного водно-спиртового лосьона системного противовоспалительного действия, содержащего фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с
30 молекулярной массой не более 12 кДа в количестве $1 \div 5$ мас % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас %, хлористый натрий в количестве до 0,5 мас %, хлористый цинк в количестве до 0,05 мас %, сульфат кальция в количестве до 0,2 мас %, вода – остальное, при рН 7.4 ± 0.2 .

35 При этом определение границы отсечки молекулярной массы пептидов осуществляют с помощью вытеснительной хроматографии и с помощью SDS-электрофореза в градиентном полиакриламидном геле.

Для получения препарата используют селезенку млекопитающих, предпочтительно КРС или свиньи.

40 Указанный технический результат достигается за счет разработки авторами настоящего изобретения эффективной технологии применения противовоспалительного препарата.

Предложенный способ подавления воспалительной реакции включает нанесение на кожу пациента эффективного количества противовоспалительного пептидного препарата.

45 Эффективное количество предложенного препарата обеспечивается, например, введением в дозе не менее 2 мг/кг веса при ежедневном, еженедельном применении, а также раз в 2 недели и ежемесячно. Курс лечения составляет от одного до нескольких месяцев, предпочтительно три, шесть или девять месяцев. Наиболее предпочтительным

является доза 2 мг/кг веса при ежедневном применении.

При этом пептиды в составе предложенного препарата без проникновения в системный кровоток воздействуют на внутрикожные дендритные клетки, направляя их на толерогенный путь дифференцировки с последующей передачей толерогенного сигнала Т-регуляторным лимфоцитам (Treg).

При этом воспалительная реакция может быть ассоциирована с псориатическим артритом, в том числе, вызванным искусственным конститутивным синтезом фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа), или активацией провоспалительных цитокинов, в том числе, вызванной бактериальным эндотоксином (ЛПС), или ревматоидным артритом, в том числе, спонтанным ревматоидным артритом, или системной воспалительной реакцией.

Используемый в способе подавления воспалительной реакции противовоспалительный препарат может быть получен вышеописанным способом получения.

Также предложено применение противовоспалительного препарата в терапии воспалительного заболевания, выбранного из хронического воспалительного заболевания, синдрома системного воспалительного ответа (реакции) или аутоиммунного заболевания, а именно, из псориатического артрита или ревматоидного артрита.

Используемый в терапии воспалительного заболевания противовоспалительный препарат может быть получен вышеописанным способом получения.

Краткое описание чертежей:

Фиг.1. Эффективность поглощения пептидов селезенки свиньи интактной человеческой кожей (анализ смывов).

Колонка: HW-50 1x25 см

Подвижная фаза: Моноэтаноламин 2%, лимонная кислота 10 мМ, рН 10.3

Обозначения испытуемых образцов:

0 - Исходный образец пептидов ≤ 12 кДа, 20 мкг

1 - Остаток пептидов на коже после смыва с помощью физраствора

2 - Остаток после смыва с помощью 15%-ого ДМСО

3 - Остаток после смыва с помощью 3%-го Tween-80

4 - Остаток после смыва с помощью 40%-го этанола

5 - Остаток после смыва с помощью 40%-го этанола + 5% ДМСО (диметилсульфоксид)

Фиг.2А. Развитие псориатического артрита у генно-модифицированных мышей *ihTNFtg* с геном фактора некроза опухолей - ФНО α (TNF α), синтез которого в организме мыши индуцируется доксициклином (Dox) при пероральном введении, где

PsA – псориатический артрит

ctr – контрольная мышь (здоровая)

Dox – результат активации TNF α с помощью Доксициклина

Фиг.2В. Демонстрация аппликации накожной формы испытуемых пептидных образцов.

Фиг.2С. Восстановление физиологических параметров *in vivo* под действием испытуемых фракций пептидов.

Одновременно с индукцией ФНО-альфа (TNF- α), начиная с нулевого дня, мышам ежедневно вводят:

- ● - физраствор (плацебо);

- □ - испытуемые пептиды внутрибрюшинно в виде растворенного в физрастворе ацетонового преципитата в дозировке 2.0 мг/кг веса в день.

- Δ - испытуемые пептиды накожно в виде лосьона с 40% этанола в дозировке 2.0 мг/кг веса в день, как показано на Фиг.2В;

Каждые 7 дней до 21 дня наблюдают четыре стандартных параметра:

WG - Weight Gain – индекс прибавки веса.

5 PASI - Psoriasis Area and Severity Index - индекс тяжести поражения псориазом.

SFP – Swelling (Fore Paws) – индекс отека передних лап.

GS – Grip Strength – индекс силы хватания передними лапами.

Фиг.3А. Определение границы отсечки молекулярной массы пептидов ПТК (РТС) и суммарной концентрации пептидов образца ПТК с помощью аналитической
10 вытеснительной хроматографии.

Колонка: HW-50 1x25 см

Подвижная фаза: Моноэтаноламин 2%, лимонная кислота 10 мМ, рН 10.3

Обозначения образцов и стандартных белков:

1 - BSA (бычий сывороточный альбумин) 69 кДа (40 мкл, 10 мг/мл)

15 2 - Цитохром С 12 кДа

3 - Образец серийного ПТК (40 мкл)

4 - Контрольный образец пептидного экстракта после ультрафильтрации на мембране
10 кДа

5 - Инсулин 5.7 кДа

20 Фиг.3В. Определение границы отсечки молекулярной массы и контроль чистоты препарата ПТК (РТС) с помощью SDS- электрофореза в градиентном полиакриламидном геле 10-18% по методу Laemmli [52]. Показано полное отсутствие белковых компонентов с молекулярной массой свыше 12 кДа.

Фиг.4. Пептиды ПТК (РТС) не активируют CD4+ Т-клетки напрямую.

25 CD4+ Т-клетки, селективно выделенные из селезенки мышей C57Bl/6, стимулируют *in vitro* в течение 5 дней различными количествами пептидов ПТК (РТС).

После инкубации клетки анализируют методом проточной цитометрии на пролиферативную активность (левая панель) или экспрессию ядерных белков Foxp3 или Tbet, которые характерны для активированных супрессорных Treg или
30 иммуногенных Th1-клеток.

Экспрессия Foxp3 и Tbet показана только для клеток, стимулированных 5000 мкг/мл пептидов ПТК (РТС).

Фиг.5 ПТК (РТС)-активированные DCs индуцируют дифференцировку клеток Foxp3+ Treg

35 (А) Клетки костного мозга мышей C57Bl/6 дифференцируют в DCs путем стимуляции с помощью GM-CSF + IL-6 в течение 6 дней. После удаления цитокинов, DCs активируют пептидами ПТК (РТС) или указанными цитокинами в течение дополнительных 24 ч. Затем DCs культивируют совместно с CD4+ клетками мышей C57Bl/6 в течение 5 дней. Т-клетки анализируют на пролиферацию и на часть клеток Foxp3+ и Tbet+.

40 (В) Репрезентативные изображения, иллюстрирующие стратегию стробирования, включая элементы FMO-контроля (fluorescence minus one), для количественной оценки параметров, показанных в (А).

Показаны средние значения ± SEM пяти повторных экспериментов. Статистический анализ проводят с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с
45 последующим множественным сравнением Tukey's для анализа значимости между формами кривых с течением времени. Показаны достоверные различия между кривыми для ПТК (РТС) и GM-CSF+IL-4 (*P < 0,05 и **P < 0,01).

Фиг.6. Класс дендритных клеток (DCs) является основной биологической мишенью

пептидов ПТК (РТС).

(А) Клетки, полученные из костного мозга, дифференцируют в DCs с помощью GM-CSF + IL-4 (10 нг/мл обоих) в течение 6 дней. После удаления цитокинов, зрелые DCs активируют пептидами ПТК (РТС) или указанными цитокинами в течение
5 дополнительных 24 ч и анализируют методом проточной цитометрии. Показаны средние значения \pm SEM пяти повторных экспериментов. Статистический анализ проводят с помощью однофакторного дисперсного анализа ANOVA с последующим множественным Tukey-сравнением. Показаны только значения, относящиеся к DCs, обработанными пептидами ПТК (РТС) (*P < 0,05, **P < 0,01 и ***P < 0,001).

(В) Репрезентативные изображения, иллюстрирующие стратегию стробирования, включая элементы FMO-контроля (fluorescence minus one), для количественной оценки параметров, показанных в (А).

Фиг.7. ПТК (РТС)-опосредованная индукция Treg зависит от взаимодействия DCs с рецепторами PD-1 и CTLA4 CD4+ Т-клеток

(А) Клетки костного мозга мышей C57Bl/6 стимулируют с помощью GM-CSF + IL-4 (по 10 нг/мл каждого) в течение 6 дней для получения зрелых DCs. После удаления цитокинов DCs активируют с помощью ПТК (РТС) еще в течение 48 ч. Сенсibilизированные DCs дважды промывают безцитокиновой средой и инкубируют с сингенными CD4+ клетками селезенки в соотношении 1:5 и в присутствии
20 специфических моноклональных антител (monAbs) (по 20 мкг/мл) в течение 5 дней. Клетки собирают и анализируют на указанные параметры методом проточной цитометрии.

Средним значениям анализируемых параметров в клетках, инкубированных с контролем IgG, присваивают значение 1. Показаны средние значения \pm SEM из четырех
25 повторных экспериментов.

Статистический анализ проводят с помощью однофакторного дисперсного анализа ANOVA с последующим множественным Tukey-сравнением. (*P < 0,05, **P < 0,01 и ***P < 0,001).

(В) Репрезентативные изображения, подчеркивающие стратегию стробирования, включая элементы управления FMO, для количественной оценки параметров, показанных в (А).

Фиг.8. Воздействие ПТК (накожная аппликация) в дозировке 2.0 мг/кг веса в день на концентрацию *in vivo* провоспалительных цитокинов TNF α (ФНО-альфа), IL-1b, IL-2 после ЛПС-провокации.

Фиг.9. Воздействие ПТК (накожная аппликация) в дозировке 2.0 мг/кг веса в день в тесте на противовоспалительную активность *in vivo*. В качестве плацебо используют физраствор. Показано постмортальное микроскопическое исследование поперечного среза кожи в районах псориазической деформации. Контроль – здоровая мышь.

Фиг.10. Суставы собаки, подверженные артриту.

40 **Примеры осуществления изобретения**

Пример 1. Подбор состава накожной лекарственной формы

Биологическая мишень противовоспалительных пептидов была определена в несколько этапов, которой оказались дендритные клетки, представленные в коже клетками Лангерганса (см. далее Пример 4), что определило достаточность оценки
45 кожной абсорбции (несмываемости образца с поверхности кожи). Для того, чтобы пептиды количественно достигали клеток Лангерганса, необходимо, чтобы они могли преодолеть, по крайней мере, тонкий кератиновый слой 10-15 мкм. Расчет на то, что пептиды, которые впитываются в кожу, способны проникнуть сквозь кератиновый

слой и достигнуть клеток Лангерганса, в дальнейшем был подтвержден явным неожиданным физиологическим эффектом (см. далее Примеры 2, 6, 7, 8).

Для демонстрации эффекта готовят концентрированный образец пептидов селезенки свиньи или КРС, полученный микрометодом, который далее используют для определения источников действующего начала (см. далее Пример 2), а именно: гомогенизируют образец селезенки в 2-х объемах 0,1%-го хлористого цинка, доводят рН гомогената с помощью 10%-го раствора аммиака до значения 8.0 ± 0.2 , замораживают при температуре -20°C , оттаивают на сетке, в полученный экстракт (экссудат) вносят 1,5 объема ацетона (обессоливание и удаление крупномолекулярного балласта выше 12 кДа), фильтруют на бумажном фильтре, в фильтрат вносят 2 объема ацетона, осадок собирают на бумажном фильтре, промывают ацетоном, сушат и растворяют в 0,9%-м растворе хлористого натрия (физраствор), фильтруют через шприцевую насадку 0,2 мкм, разводят до необходимой концентрации.

Исходя из данной постановки задачи, был разработан состав раствора, который наилучшим образом способствует пассивному поглощению макромолекул нетравмированной кожей. Испытывали неионные детергенты, этанол, диметилсульфоксид и их комбинации. Эффективность абсорбции пептидов *in vivo* измеряли путем хроматографического определения остаточного количества и состава пептидов на интактной человеческой коже после пассивного впитывания образца. Неожиданным образом таким оптимальным растворителем оказался водный раствор, содержащий 40 мас % этанола. Эффективность поглощения кожей пептидов менее 12 кДа составила около 60% без заметной дискриминации по молекулярным массам (Фиг. 1).

В эксперименте в качестве исходного контрольного образца используют обессоленный образец пептидов в диапазоне до 12 кДа с концентрацией 40 мг/мл, полученный из суммарного экстракта по вышеописанной методике с дробной ацетоновой очисткой. Для составления испытуемых образцов исходный образец разводят в физрастворе с добавлением компонентов, указанных на диаграмме.

На чистую интактную человеческую кожу *in vivo* наносят по 10 мкл образцов с суммарным количеством пептидов по 20 мкг. После самопроизвольного впитывания и высыхания образца, остаток пептидов смывают с кожи дважды каждый раз по 30 мкл подвижной фазы (2% моноэтаноламин, 0,01 М цитрат, рН 10.3), отбирают микродозатором и собирают в микропробирку. Смывы анализируют с помощью вытеснительной аналитической хроматографии.

Выбор аналитической хроматографии определен двумя причинами, а именно:
 (а) высокая чувствительность и воспроизводимость,
 (б) возможность оценки дискриминации абсорбции в зависимости от молекулярной массы пептидов.

Результат: Наиболее эффективным оказался 40%-й этанол (образец № 4), в т.ч. с добавлением ДМСО до 5% (образец № 5). При этом дискриминация по молекулярной массе неожиданным образом отсутствовала. Таким образом, лекарственная форма была выбрана как спирт-содержащая композиция, конкретно – водно-спиртовой лосьон.

Пример 2. Определение природного источника лекарственного начала для оптимизации технологии его получения

Первоначальным объектом исследования были выбраны именно пептиды. Для этого были известны косвенные данные. Впоследствии выбор оправдался.

Несмотря на то, что опытами А.Б.Цыпина и соавт. [1] ранее было показано, что противовоспалительными свойствами обладает ультрафильтрат селезенки до 50 кДа,

исследование необходимо было провести заново, т.к. в силу опасности развития побочных эффектов, в первую очередь аутоиммунизации, отсечка в 50 кДа совершенно недостаточна, и необходимо было точно определить источник действующего начала, и он был выявлен в безопасном диапазоне до 12 кДа.

5 В первой серии опытов используют пептиды из плазмы крови и различных органов и тканей свиньи (всего 4 источника), полученные из суммарного экстракта по методике с дробной ацетоновой очисткой, описанной в Примере 1.

Из полученных фракций формировали образцы пептидов в двух вариантах:

(а) накожный вариант с суммарной концентрацией 6 мг/мл в 40%-м этаноле,
10 (б) инъекционный внутрибрюшинный вариант с концентрацией 1 мг/мл в физиологическом растворе.

Для тестирования фракций, обладающих наилучшим лечебным действием против искусственного псориатического артрита, использовали генно-модифицированных мышей ihTNFtg [51], несущих дополнительный ген фактора некроза опухоли (ФНО-
15 альфа – TNF- α), главного провоспалительного цитокина. Ген содержит промотор, активируемый доксициклином (Dox), который мыши получают с питьевой водой. При активации промотора TNF- α у мышей развивается тяжелый псориатический артрит (Фиг.2А). Данных мышей используют как специфическую чувствительную модель при
20 выборе фракций, обладающих системным лечебным действием в трансдермальной лечебной форме.

Одновременно с индукцией ФНО-альфа (TNF- α), начиная с нулевого дня, мышам ежедневно вводят:

- ● - физраствор (плацебо);
- □ - испытуемые пептиды внутрибрюшинно в виде растворенного в физрастворе
25 ацетонового преципитата в дозировке 2.0 мг/кг веса в день (на мышь 30 г инъекция 60 мкл в концентрации пептидов 1 мг/мл);
- Δ - испытуемые пептиды накожно в виде лосьона с 40% этанола с дозировкой 2.0 мг/кг веса в день, как показано на Фиг.2В (на мышь 30 г кожное нанесение 2x5 мкл в концентрации 6 мг/мл);

30 Каждые 7 дней до 21 дня наблюдают четыре стандартных параметра:

WG - Weight Gain – индекс прибавки веса.

PASI - Psoriasis Area and Severity Index - индекс тяжести поражения псориазом.

SFP – Swelling Fore Paws – индекс отека передних лап.

GS – Grip Strength – индекс силы хватания передними лапами.

35 На Фиг.2С показан результат для наиболее адекватного варианта пептидов из селезенки свиньи, который далее был принят за основу при разработке технологии получения противовоспалительного препарата (см. Пример 3). Аналогичные данные были получены при использовании селезенки КРС.

Результаты:

40 В данной серии опытов были определены наиболее богатые источники (органы и ткани), содержащие лечебное начало. Поскольку лечебной активностью обладали экстракты не единственного органа и ткани млекопитающих (КРС и свинья), был сделан вывод о вездесущности в организме противовоспалительных регуляторных пептидов, но для наилучшей стандартизации последующего промышленного получения пептидного
45 компаунда была выбрана селезенка, наиболее богатая пептидным компаундом с противовоспалительным действием.

При накожном и внутрибрюшинном введении пептиды селезенки одинаково эффективно восстанавливают физиологические параметры, преодолевая псориатический

артрит, вызываемый постоянным воздействием суперэкспрессии ФНО-альфа (TNF- α). При этом важно отметить, что внутрибрюшинное введение принципиально отличается от внутривенного или внутримышечного, т.к. введенные пептиды не попадают непосредственно в системный кровоток, а воздействуют на клетки стенки кишечника.

5 Дополнительно выявлено системное общеорганизменное действие пептидов, когда нанесение пептидов на локальную область ушей или внутрибрюшинно заставляет нормализоваться дистальные области организма – суставы и кожу. Показан однозначный терапевтический эффект пептидов селезенки на фоне перманентной принудительной суперэкспрессии наиболее мощного провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (ФНО-альфа - TNF α), что говорит о том, что пептидный
10 компаунд имеет не только противовоспалительный эффект, но действует на уровне более глубокой нормализации иммунитета, т.е. имеет толерогенное действие. Это далее было подтверждено в опытах *in vitro* (см. Фиг.4-7). На этом основании он получил условное наименование "Пептидного Толерогенного Компаунда" – ПТК (Peptide
15 Tolerogenic Compound – РТС).

С помощью тест-модели генетически модифицированных мышей, несущих дополнительный ген фактора некроза опухоли (ФНО-альфа – TNF- α) [51], отработана оптимальная технология получения ПТК (см. Пример 3).

Пример 3. Описание технологии получения ПТК (РТС)

20 Измельчают сырье (селезенку КРС или свиней) на мясорубке, смешивают с 0,1%-м раствором хлористого цинка в соотношении 2 массовых частей раствора на 1 массовую часть фарша, полученный гомогенат при интенсивном перемешивании закисляют до значения 3.0 ± 0.2 с помощью 5 М раствора соляной кислоты для фиксации крупномолекулярной фракции, экстрагируют пептиды доведением рН гомогената до
25 значения 8.0 ± 0.2 с помощью 5 М раствора гидроксида натрия, получают осветленный экстракт с помощью замораживания-экссудации или проточного центрифугирования (используются стандартные методики осветления пептидных экстрактов, известные, например, из [1], [2], [50]), добавляют 5 М раствор серной кислоты до значения рН
30 2.5 ± 0.2 (вторая фиксация крупномолекулярного балласта), получают кислый фильтрат с помощью нутч-фильтра, нейтрализуют фильтрат 30%-й водной взвесью гидроксида кальция до значения рН 7.4 ± 0.2 (осаждение сульфата), получают нейтральный фильтрат с помощью нутч-фильтра, вносят в фильтрат равный объем 96%-го этанола (финишное осаждение крупномолекулярного балласта и обессоливание) с получением расчетного содержания этанола 40,1 мас % (рассчитано с учетом плотности 96%-го этанола 0.806
35 и уменьшения результирующего объема водно-спиртовой смеси с коэффициентом 0.964 [55]), получают фильтрат с помощью нутч-фильтра (готовый ПТК в форме лосьона).

Определение границы отсечки молекулярной массы пептидов ПТК (РТС) и суммарной концентрации образца пептидов осуществляют с помощью аналитической вытеснительной хроматографии (Фиг.3А).

40 Корректное определение суммарной концентрации пептидов в ПТК осуществляют путем сравнения интеграла кривой "1" (образцовый раствор BSA с концентрацией 10 мг/мл) и интеграла кривой "3" (образец ПТК равного объема с BSA). В представленном случае (Фиг.3А) суммарная концентрация пептидов в полученном образце ПТК составляет ≈ 15 мг/мл $\approx 1,5\%$.

45 Определение границы отсечки молекулярной массы и контроль чистоты препарата ПТК (РТС) осуществляют с помощью SDS- электрофореза в градиентном полиакриламидном геле 10-18% по методу Laemmli [52] (Фиг.3В). Показано полное отсутствие белковых компонентов с молекулярной массой свыше 12 кДа.

Предложенный способ получения препарата низкомолекулярных пептидов имеет следующие преимущества:

- Способ исключает критические аппаратные и процессные ограничения, а именно: ацетоновое осаждение, диализ, хроматографию, лиофилизацию, ультрафильтрацию.

5 Благодаря этому он обеспечивает максимально экономичное и неограниченное промышленное масштабирование.

- С помощью эмпирически подобранного сочетания концентраций кислот, хлористого цинка, гидроксида кальция и этанола предложенный способ позволяет четко ограничивать сверху молекулярную массу целевых пептидов на уровне от 10 до 12 кДа, но не выше 12 кДа, без применения токсичного взрывоопасного ацетона и дорогостоящих низкопроизводительных методов ультрафильтрации и хроматографии, которые используются в предшествующих технологиях. Цинк в данном случае играет двойную роль – как дифференциальный осадитель и необходимый кофактор регуляторных пептидов.

15 - Благодаря сочетанию серной кислоты и гидроксида кальция в качестве осадителя сульфата, и этанола в качестве вторичного осадителя, содержание солей в конечном продукте не превышает 0,05% хлористого цинка, 0,2% сульфата кальция (максимальная растворимость [53]), 0,5% хлористого натрия при pH 7.4±0.2 без использования процедуры диализа и/или обессоливания на колонках. Это определяет физиологически комфортный состав готового лосьона для кожного применения.

20 Таблица 1. Состав предложенного водно-спиртового лосьона, полученного предложенным способом

Компоненты лосьона, при pH 7.4±0.2	Количественное содержание, % мас. к общей массе композиции
Фракция очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа, а именно, 0,4-12 кДа	не менее 1, а именно, 1 ÷ 5
96% этиловый спирт (этанол)	40
хлористый натрий	0 - 0,5
хлористый цинк	0 - 0,05
сульфат кальция	0 - 0,2
вода	остальное

Все последующие эксперименты проводят с использованием стандартных серийных образцов ПТК (РСТ) в качестве унифицированного источника пептидов для соблюдения воспроизводимости результатов.

35 Для экспериментов *in vitro* пептиды осаждают из ПТК с помощью двухступенчатой ацетоновой процедуры. Вначале к раствору ПТК добавляют 1 объем ацетона для осаждения остаточных солей и фильтруют. В фильтрат вносят 2 объема ацетона для получения пептидного преципитата, преципитат промывают ацетоном, собирают на бумажном фильтре и высушивают под стерильным ламинарным потоком воздуха.

40 Высушенный преципитат растворяют в физиологическом растворе, приводят штоковый раствор к концентрации 10 мг/мл, стерилизуют с помощью шприцевой фильтровальной насадки с мембраной 0,2 мкм, расфасовывают и замораживают мелкими порциями.

Пример 4. Определение биологической мишени ПТК *in vitro*

45 Для определения влияния пептидов ПТК (РСТ) непосредственно на Т-клетки, CD4+ клетки выделяют из селезенки мышей C57BL/6 с помощью технологии MACS (технология магнитного разделение клеточных популяций на основе поверхностных антигенов) и стимулируют *in vitro* в течение 5 дней различными количествами пептидов ПТК.

Поскольку дифференцировка и/или активация лимфоцитов обычно связана с

интенсивной пролиферацией [56], CD4+клетки предварительно метят флуорохромом CFSE, а степень пролиферации клеток (количественно определяют как долю клеток CFSE¹⁰), и количество Foxp3 - или Tbet-позитивных клеток анализируют методом проточной цитометрии. Foxp3 и Tbet являются основными транскрипционными факторами, которые инициируют и поддерживают развитие линий Treg и Th1 из незрелых (naïve) клеток-предшественников Th, соответственно. Их обычно используют в качестве маркеров противовоспалительных Treg и воспалительных Th1-клеточных сублиний.

Результат (Фиг.4): Стимуляция CD4+ клеток с помощью ПТК не влияет на пролиферацию Т-клеток или их дифференцировку в подтипы Treg или Th1.

Для полной активации CD4+ Т-клеткам обычно требуется вовлечение Т-клеточного рецептора и ко-стимулирующих молекул, которые обычно обеспечиваются взаимодействием с антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки (DCs). В этих условиях Т-клетки начинают пролиферировать и, в зависимости от цитокиновой среды, дифференцируются в специфическое подмножество Т-хелперов.

Таким образом, на следующем этапе анализируют, могут ли пептиды ПТК стимулировать Т-клетки опосредованно через активацию DCs. Для этого клетки костного мозга, выделенные от мышей C57Bl/6/c, дифференцируют в зрелые DCs путем стимуляции GM-CSF+IL-4, как описано в работе Varga et al. [54], а затем активируют в течение 2 дней с помощью пептидов ПТК или IL-10, TGFβ и GM-CSF+IL-4, т.е. известными толерогенными и иммуногенными триггерами активации дендритных клеток (DCs). Затем DCs в течение 5 дней культивируют совместно с незрелыми (naïve) CD4+ клетками, выделенными из селезенки мышей C57Bl/6, в так называемом MLR-анализе (смешанная реакция лимфоцитов), а количество пролиферирующих и Foxp3 - и Tbet-позитивных клеток определяют методом проточной цитометрии.

Когда DCs активируют с помощью пептидов ПТК, они способствуют значительно более высокой пролиферации CD4+ Т-клеток, чем любые другие использованные стимулы. Более того, количество Foxp3+ толерогенных Treg-клеток, образованных ПТК-активированными дендритными клетками DCs, такое же высокое, как и у DCs, активированных IL-10 или TGFβ, и значительно выше, чем у DCs, активированных иммуногенной комбинацией GM-CSF + IL-4. Напротив, количество Tbet-позитивных иммуногенных клеток остается самым низким при совместном культивировании CD4+ клеток с ПТК-активированными DCs и значительно отличается от количества Tbet+ CD4+ клеток, индуцированных дендритными клетками DCs, активированными суммой цитокинов GM-CSF + IL-4.

Результат (Фиг.5): Пептиды ПТК стимулируют Т-клетки опосредованно, через активацию дендритных клеток (DCs). Пептиды ПТК непосредственно влияют на DCs и дифференцируют их в толерогенные клетки, которые, в свою очередь, способствуют поляризации незрелых (naïve) CD4+ Т-клеток в толерогенные Foxp3+ Treg-клетки.

Пример 5. Расшифровка каскада толерогенной активации *in vitro*

В данном примере исследуют, действительно ли пептиды ПТК непосредственно стимулируют DCs. Для этого клетки костного мозга инкубируют с цитокинами GM-CSF + IL-4 в течение 6 дней для получения зрелых DCs. После отмывания цитокинов клетки стимулируют с помощью ПТК (PCT), толерогенными (IL-10, TGFβ) или иммуногенными (GM-CSF + IL-4) цитокинами еще в течение 24 ч, а CD11c+/MHCII+ дендритные клетки DCs анализируют методом проточной цитометрии.

По сравнению с GM-CSF + IL-4, пептиды ПТК (PCT) оказываются только слабыми индукторами CD80 - лиганда, как правило, интенсивно экспрессируемого иммуногенными DCs, и, таким образом, фенотип Т-клеток, стимулированных ПТК,

скорее напоминает фенотип, полученный после стимуляции толерогенным IL-10 и фактором роста TGFβ.

При индукции CD86 пептиды ПТК (РТС) столь же эффективны, как GM-CSF + IL-4, но несколько менее эффективны, чем TGFβ. Напротив, количество клеток, экспрессирующих типичные толерогенные маркеры, такие как поверхностные лиганды PD-L1 и CD205, но не внутриклеточные IDO, было значительно увеличено при стимуляции DCs пептидами ПТК (РТС) по сравнению со стимуляцией GM-CSF + IL-4. Из проанализированных толерогенных маркеров рецептор CD205 был наиболее сильно индуцирован пептидами ПТК (РТС). Ни IL-10, ни TGFβ не могут так сильно активировать этот маркер. По своей способности стимулировать внутриклеточный белок IDO или поверхностный рецептор CD86 пептиды ПТК (РТС) были промежуточными по сравнению с IL-10 и TGFβ.

Результат (Фиг.6): Пептиды ПТК (РТС) действительно стимулируют зрелые DCs к толерогенной дифференцировке и механизм активации DCs пептидами ПТК принципиально отличается от механизма активации IL-10 или TGFβ.

Остается вопрос, будет ли блокирование PD-1 - PD-L1/2 и/или CTLA4 - CD80/86 взаимодействий между DCs и Т-клетками, которые, как известно, важны для DCs-опосредованной дифференцировки Treg-клеток, предотвращать ПТК-опосредованную толерогенную активность DCs.

Для ответа на этот вопрос, полученные из костного мозга, созревшие под действием GM-CSF + IL-4 и DCs, активированные пептидами ПТК, совместно культивируют с сингенными незрелыми (naïve) CD4+ Т-клетками в присутствии или отсутствии функционально блокирующих анти-PD-1 и/или анти-CTLA4 моноклональных антител (monAbs).

В то время как количество пролиферирующих Т-клеток несколько увеличено в присутствии антител по сравнению с контролем IgG, доля Foxp3+ Treg значительно снижена в присутствии анти-PD-1 monAb и, в меньшей степени, анти-CTLA4 monAb. Кроме того, наличие обоих функционально-блокирующих антител обеспечивает наиболее сильный эффект, предполагая аддитивное действие.

Этот эффект наблюдают как в пролиферирующих, так и в непролиферирующих клетках, но он более выражен в покоящихся CD4+ клетках. Экспрессия иммуногенного транскрипционного фактора Tbet показывает противоположный результат. Количество Tbet+клеток увеличивается в присутствии функционально блокирующих анти-PD-1 и анти-CTLA4 антител, причем эффект наблюдают только у пролиферирующих CD4+ Т-клеток.

Результат (Фиг.7): Пептиды ПТК (РТС) в первую очередь нацелены на DCs и индуцируют экспрессию лигандов, таких как PD-L1 или CD86. Активированные DCs, в свою очередь, преобразуют незрелые (naïve) CD4+ клетки в толерогенные Treg посредством прямых взаимодействий PD-1 ⇌ PD-L1/2 и/или CTLA4 ⇌ CD80/86.

Пример 6. Воздействие ПТК (накожная аппликация) на концентрацию *in vivo* провоспалительных цитокинов.

Используют беспородных белых мышей, которым вводят ЛПС (липополисахарид – пироген) в сочетании с накожным введением ПТК в дозировке 2.0 мг/кг веса (как на Фиг.2В). Измеряют концентрацию цитокинов в плазме крови.

Влияние пептидов ПТК на концентрацию цитокинов *in vivo* продемонстрировано на Фиг.8. Измеряют концентрацию в плазме крови следующих цитокинов: TNFα (ФНО-альфа), IL-1b, IL-2.

Результат: При ежедневных аппликациях ПТК в течение месяца в форме водно-

спиртового лосьона в дозировке 2,0 мг/кг веса концентрация в крови провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1b и IL-2 достоверно снижается по сравнению с плацебо. Ни у одного из животных не было зарегистрировано аллергии в месте нанесения препарата, а также развития системной аллергической реакции на препарат.

5 Пример 7. Проведение патологоанатомического исследования для демонстрации эффекта ПТК в тесте на противовоспалительную активность *in vivo*

Для данного эксперимента также используют генно-модифицированных мышей ihTNFtg [51] с принудительной суперпродукцией фактора некроза опухолей - ФНО (TNF α), вследствие чего у мышей развивается выраженный псориатический артрит (см. 10 Фиг.2А).

Одновременно с индукцией ФНО-альфа (TNF- α), начиная с нулевого дня, мышам ежедневно наносят физраствор (в качестве плацебо) или пептиды ПТК на кожу на безволосную часть ушей, как показано на Фиг.2В, в дозировке 2,0 мг/кг веса в день. Через 10 дней постмортально проводят микроскопическое исследование поперечного 15 среза кожи в дистальных районах псориатической деформации (Фиг.9).

Результат: При воздействии ПТК в форме кожного лосьона в дозировке 2,0 мг/кг веса в день артритно-псориатическая деформация подавляется с эффективностью около 70%. В дополнительном контрольном опыте без индукции TNF- α ни у одного из 5 20 животных не было зарегистрировано аллергии в месте нанесения препарата, а также развития системной аллергической реакции на препарат.

Пример 8. Лечение ревматоидного артрита у крупных млекопитающих.

Девять испытуемых собак различных пород и беспородных в возрасте от 4 до 8 лет и весом от 12 до 25 кг были предоставлены для лечения их владельцами. Перед 25 применением ПТК состояние животных было задокументировано ветеринарными врачами, у которых они находились на регулярном лечении. У всех животных артрит не был следствием травмирования. Также были исключены гнойный артрит и хламидийный артрит.

До применения пептидов все девять собак лечили от 1,5 до 3 лет либо безуспешно, либо с временным терапевтическим эффектом с помощью физиотерапии и известными 30 противовоспалительными средствами (Стоп-артрит, Артрогликан, Лошадиная сила, Кетофен, Римадил, Хондартрон, Хондроитин Комплекс, Хондролон, Румалон). Кортикостероидные препараты испытуемым собакам ранее не назначали.

Для чистоты эксперимента все противовоспалительные препараты перед началом применения ПТК были отменены.

35 В силу специфики поведения животных, нанесение лосьона ПТК осуществляли только на тазобедренную область и в область позвоночника во избежание интенсивного слизывания (Фиг.10). Аппликацию осуществляли следующим образом: на суставы наносили лосьон ПТК в концентрации от 1% до 5% одноразовой полиэтиленовой 40 пипеткой под шерсть непосредственно на кожу в объеме 0,5-1,5 мл в каждую точку (не менее 3 точек) и прижимали полиэтиленовой пленкой на 3 минуты. Этого времени по опыту достаточно для развития терапевтического эффекта. Благодаря наличию в лекарственной форме 40%-го этанола лосьон ПТК легко распространяется по коже под шерстью. При нанесении раствора ПТК каждый раз соблюдали дозировку не менее 2 мг/кг веса, исходя из концентрации пептидов и веса животного. Препарат применяли 45 ежедневно, еженедельно, раз в 2 недели и ежемесячно.

Собакам №№ 1,2,3 (наиболее легкая группа) проведен 3-месячный курс с последующим наблюдением в течение 6-9 месяцев после завершения лечения (еженедельное применение).

Собакам №№ 4,5,6,7 проведен 6-месячный курс с последующим наблюдением в течение 3-6 месяцев после завершения лечения (№№4,5 с нанесением раз в 2 недели, №№6,7 – ежемесячно).

Собакам №№ 8,9 (первоначально слабо отвечающие на лечение) проведен 9-месячный курс с последующим наблюдением в течение 3 месяцев после завершения лечения (первый квартал – еженедельное применение, в середине курса (второй квартал) – ежедневно, в конце (третий квартал) – раз в неделю).

Результаты приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Данные по терапевтическому эффекту ПТК на собаках

10

Собаки	1-3 мес		4-6 мес		7-9 мес		10-12 мес	
	ПТК	Состояние	ПТК	Состояние	ПТК	Состояние	ПТК	Состояние
№1	+	+++	—	+++	—	+++	—	Н/Д
№2	+	+++	—	+++	—	+++	—	+++
№3	+	+++	—	+++	—	+++	—	Н/Д
№4	+	++	+	+++	—	+++	—	Н/Д
№5	+	+	+	+++	—	+++	—	+++
№6	+	+	+	+++	—	+++	—	Н/Д
№7	+	++	+	+++	—	+++	—	+++
№8	+	+	+	+	+	+++	—	+++
№9	+	+	+	++	+	+++	—	+++

15

Обозначения:

«+» - недостаточный терапевтический эффект, сохранялись боли в суставах при прощупывании суставов;

«++» - удовлетворительный терапевтический эффект, при прощупывании суставов болевых реакций не наблюдалось, но при движении наблюдалось некоторое ограничение подвижности или нарушение координации;

«+++» - максимальный терапевтический эффект, не наблюдалось болевых реакций при прощупывании суставов и заметных ограничений подвижности или нарушений координации при движении;

«Н/Д» - нет данных.

20

Важно также, что в течение всего наблюдаемого периода в течение лечения и в последующий период побочные явления не наблюдались. Животные после излечения проявляли здоровое активное поведение, температура и стул были в норме. Не было отмечено грибковых, вирусных и бактериальных инфекций, что свидетельствует в пользу того, что пептиды не проявляли иммуносупрессорного воздействия. Ни у одного из животных не было зарегистрировано аллергии в месте нанесения препарата, а также развития системной аллергической реакции на препарат.

25

Обращает на себя внимание то, что воздействие пептидов только на бедра и позвоночник приводит к явному терапевтическому эффекту и в остальных больных суставах, хотя в дистальных суставах лечебный эффект достигался с 1-1,5 месячной задержкой, что подтверждает факт системного общеорганизменного действия накожной лекарственной формы ПТК.

30

ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Патент RU 2152219 C1, 10.07.2000.

2. Патент RU 2033796 C1, 30.04.1995.

35

3. Herwadkar A, Banga AK. Peptide and protein transdermal drug delivery. Drug Discov. Today Technol. 2012; 9(2):e147–e154.

4. Benjamin J Bruno, Geoffrey D Miller and Carol S Lim. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. Ther Deliv. 2013 Nov; 4(11): 1443–1467.

5. Sharma A. Transdermal Drug Delivery System Market Size, Outlook Analysis Report to 2025. 2019; Res.Gate, Jul. <https://www.marketresearch.com/OG-Analysis-v3922/Transdermal-Drug-Delivery-System-Size-12510535/>
6. Sharma J.P.K., Bansal S, Banik A. Noninvasive routes of proteins and peptides drug delivery. Indian J. Pharm. Sci. 2011; 73(4):367–375.
7. Ahmed O.A.A. et al. Optimization of self- nanoemulsifying systems for the enhancement of in vivo hypogly- cemic efficacy of glimepiride transdermal patches. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Jul; 11:1005–13.
8. Benson HA. Transfersomes for transdermal drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 2006; 3:727–37.
9. Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers. Clin Pharmacokinet. 2003; 42(5):461–74.
10. Desai P. et al. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. Mol Membr Biol. 2010; Oct; 27(7):247-59.
11. Mutalik S. et al. Glipizide matrix transdermal systems for diabetes mellitus: preparation, in vitro and preclinical studies. Life Sci. 2006; Sep 6; 79(16):1568-77.
12. Rastogi R. et al. Investigation on the synergistic effect of a combination of chemical enhancers and modulated iontophoresis for transdermal delivery of insulin. Drug Dev Ind Pharm 2010; Aug; 36(8):993-1004.
13. Rastogi R. et al. Electroporation of polymeric nanoparticles: an alternative technique for transdermal delivery of insulin. Drug Dev Ind Pharm 2010; Nov; 36(11):1303-11.
14. US Patent Application 20100040702, 2010. Chemical composition for skin care formulations.
15. Waghule T. et al. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. Biomed Pharmacother. 2019; Jan;109:1249-1258.
16. Arora A. et al. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. Int. J. Pharm. 2008; 364(2):227–236.
17. Garland M.J. et al. Dissolving polymeric microneedle arrays for electrically assisted transdermal drug delivery. J. Control. Release. 2012; 159(1):52–59.
18. Wilson EJ. Three Generations: The Past, Present, and Future of Transdermal Drug Delivery Systems. 2011; Pharmcon; SC, USA, Google Scholar.
19. Herwadkar A, Banga AK. Peptide and protein transdermal drug delivery. Drug Discov. Today Technol. 2012; 9(2):e147–e154
20. Pathan IB, Setty CM. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. Trop. J. Pharm. Res. 2009; 8(2):173–179.
21. Flynn G.L., Stewart B. Percutaneous Drug Penetration: Choosing Candidates for Transdermal Development. Drug Devel. Res. 1988; 13:169-185.
22. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. Exp. Dermatol. 2000; 9(3):165–169.
23. Ruan RQ, et al. Transdermal delivery of human epidermal growth factor facilitated by a peptide chaperon. Eur. J. Med. Chem. 2013; 62:405–409.
24. Сборник трудов G.F.Murphy <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/2050382893-G-F-Murphy>
25. Blauvelt A. Langerhans Cells. 1998; Encyclopedia of Immunology (Second Edition) <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/langerhans-cell>
26. Патент RU 2462265 C1, 27.09.2012.
27. Thakker, K.; Chern, W. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms - Case study. Dissol. Technol., 2003; May, p.10-15.
28. Cardot, J-M.; Beyssac, E.; Alric, M. In vitro-in vivo correlation: Importance of dissolution

in IVIVC. *Dissol. Technol.* 2007; Feb p.15-19.

29. Frum, Y. et al. Towards a correlation between drug properties and in vitro transdermal flux variability. *Int. J. Pharm.*, 2007; May v.336(1): 140-147.

30. Godin, B.; Touitou, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007; Sep 30; 59 (11):1152-61.

31. Yang, Y. et al. Development and validation of in vitro-in vivo correlation (IVIVC) for estradiol transdermal drug delivery systems. *J. Control. Rel.*, 2015; Jul 13; 210:58-66.

32. Franz T.J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Comparative Study Curr Probl Dermatol.* 1978; 7:58-68.

33. Gannu, R. et al. Development of nitrendipine transdermal patches: In vitro and ex vivo characterization. *Curr. Drug Deliv.*, 2007; Jan; 4(1):69-76.

34. Mcauley, W.J. et al. The effects of esterified solvents on the diffusion of a model compound across human skin: An ATR-FTIR spectroscopic study. *Int. J. Pharm.*, 2013; Apr 15; 447(1-2):1-6.

35. Caspers, P.J. et al. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*, 1998; 4(5 Suppl):S31-9.

36. Ashtikar, M. et al. Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013; 50(5), p.601-608.

37. Franzen, L. et al. Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy - A systematic in vitro validation study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015; Sep;95(Pt A):110-6.

38. Nair, A. et al. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2013; v.49, n.3, p.423-434.

39. Zorin, S. et al. In vitro test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann. Occup. Hyg.*, 1999; Aug 43(6):405-13.

40. Heard, C.M. et al. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of guarana, *Paullinia Cupana*. *Int. J. Pharm.*, 2006; Jul 6;317(1):26-31.

41. Chen, L.; Han, L.; Lian, G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013; Feb 9;65(2):295-305.

42. Delgado-Charro, M.B.; Guy, R.H. Effective use of transdermal drug delivery in children. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014; Jun;73:63-82.

43. Ruela A.L.M. et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2016; Jul/Sep vol.52 no.3.

44. Патент SU 1077089 C, 15.11.1994.

45. Патент SU 1112606 A1, 27.04.1982.

46. Патент SU 1218521 A1, 1980.

47. Патент SU 1522485 C, 15.11.1994.

48. Патент SU 944191C, 15.08.1994.

49. Патент RU 2104702 C1, 20.02.1998.

50. Патент CN 1557465A, 2004. <https://patents.google.com/patent/CN1557465A/en>

51. Retser E. et al. Doxycycline-Induced Expression of Transgenic Human Tumor Necrosis Factor α in Adult Mice Results in Psoriasis-like Arthritis, *Arthritis & Rheumatism*, 2013; Sep;65 (9):2290-300.

52. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227(5259), 680-685.

53. Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник. Ленинград, "Химия", 1991.

54. Varga, G. et al. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood*,

2007; 109:661-669.

55. Справочник по электротехническим материалам. Под ред. Ю.В.Корицкого и др. Том 1 (3-е изд., 1986) <https://studizba.com/files/show/djvu/3147-1-spravochnik-po-elektrotehnicheskim.html>

56. Bocharov, G. et al. Feedback regulation of proliferation vs. differentiation rates explains the dependence of CD4 T-cell expansion on precursor number. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; Feb 22;108(8):3318-23.

(57) Формула изобретения

1. Противовоспалительный препарат на основе пептидов селезенки млекопитающих, отличающийся тем, что препарат представлен в форме накожного водно-спиртового лосьона системного противовоспалительного действия, содержащий фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа в количестве 1-5 мас. % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас. %, хлористый натрий в количестве 0-0,5 мас. %, хлористый цинк в количестве 0-0,05 мас. %, сульфат кальция в количестве 0-0,2 мас. %, вода – остальное, при рН 7,4±0,2.

2. Противовоспалительный препарат по п.1, отличающийся тем, что содержит фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа в количестве 1-5 мас. % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас. %, вода – остальное, при рН 7,4±0,2.

3. Противовоспалительный препарат по п.1, отличающийся тем, что содержит фракцию очищенных пептидов селезенки млекопитающих с молекулярной массой не более 12 кДа в количестве 1-5 мас. % к общей массе композиции, 96% этанол в количестве 40 мас. %, хлористый натрий в количестве до 0,5 мас. %, хлористый цинк в количестве до 0,05 мас. %, сульфат кальция в количестве до 0,2 мас. %, вода – остальное, при рН 7,4±0,2.

4. Противовоспалительный препарат по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что препарат нормализует баланс воспалительных и противовоспалительных реакций, который определяют по нормализации *in vivo* уровня цитокинов ФНО-альфа, IL-1-бета и IL-2.

5. Противовоспалительный препарат по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что препарат предупреждает развитие псориатического артрита или ревматоидного артрита.

6. Способ подавления воспалительной реакции, включающий нанесение на кожу пациента эффективного количества противовоспалительного пептидного препарата по любому из пп.1-5.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что пептиды в составе противовоспалительного препарата без проникновения в системный кровоток воздействуют на внутрикожные дендритные клетки, направляя их на толерогенный путь дифференцировки с последующей передачей толерогенного сигнала Т-регуляторным лимфоцитам.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что воспалительная реакция ассоциирована с псориатическим артритом или ревматоидным артритом.

9. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный препарат применяют в дозе 2 мг/кг веса при ежедневном нанесении.

10. Применение противовоспалительного препарата по любому из пп.1-5 в терапии воспалительного заболевания.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что воспалительное заболевание выбрано из хронического воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

12. Применение по п.10, отличающееся тем, что воспалительным заболеванием

является псориатический артрит или ревматоидный артрит.

13. Применение по п.10, отличающееся тем, что препарат применяют в дозе 2 мг/кг веса при ежедневном нанесении на кожу пациента.

14. Применение по п.10, отличающееся тем, что пептиды в составе
5 противовоспалительного препарата без проникновения в системный кровоток
воздействуют на внутрикожные дендритные клетки, направляя их на толерогенный
путь дифференцировки с последующей передачей толерогенного сигнала Т-
регуляторным лимфоцитам.

10

15

20

25

30

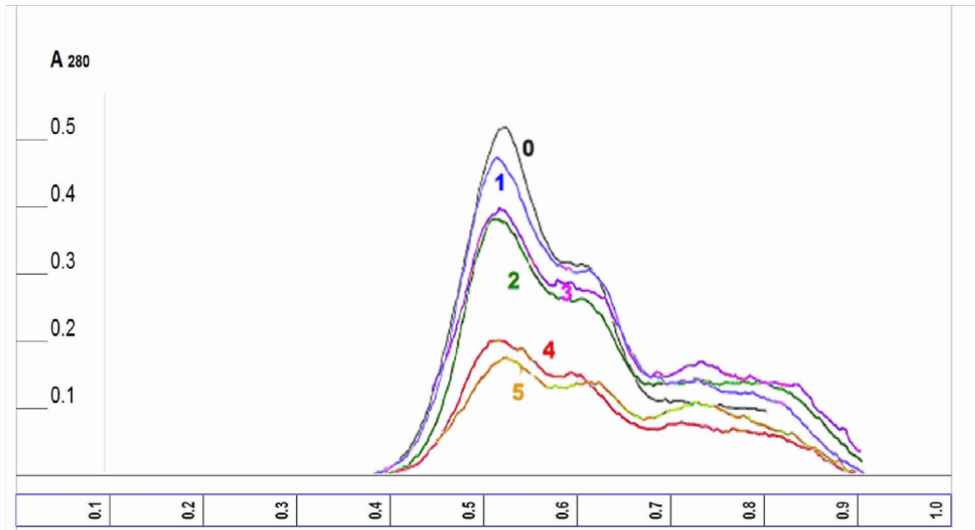
35

40

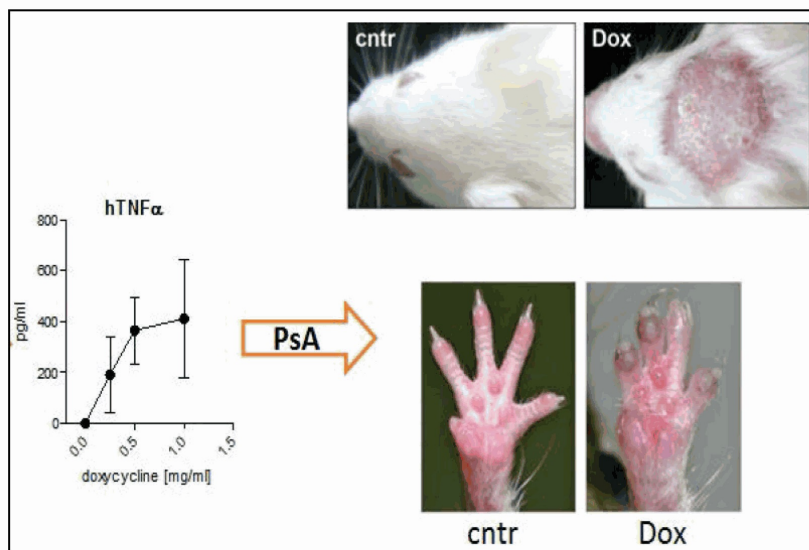
45

1

1/8



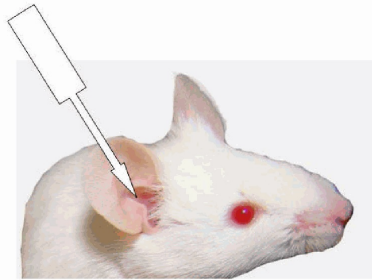
Фиг.1



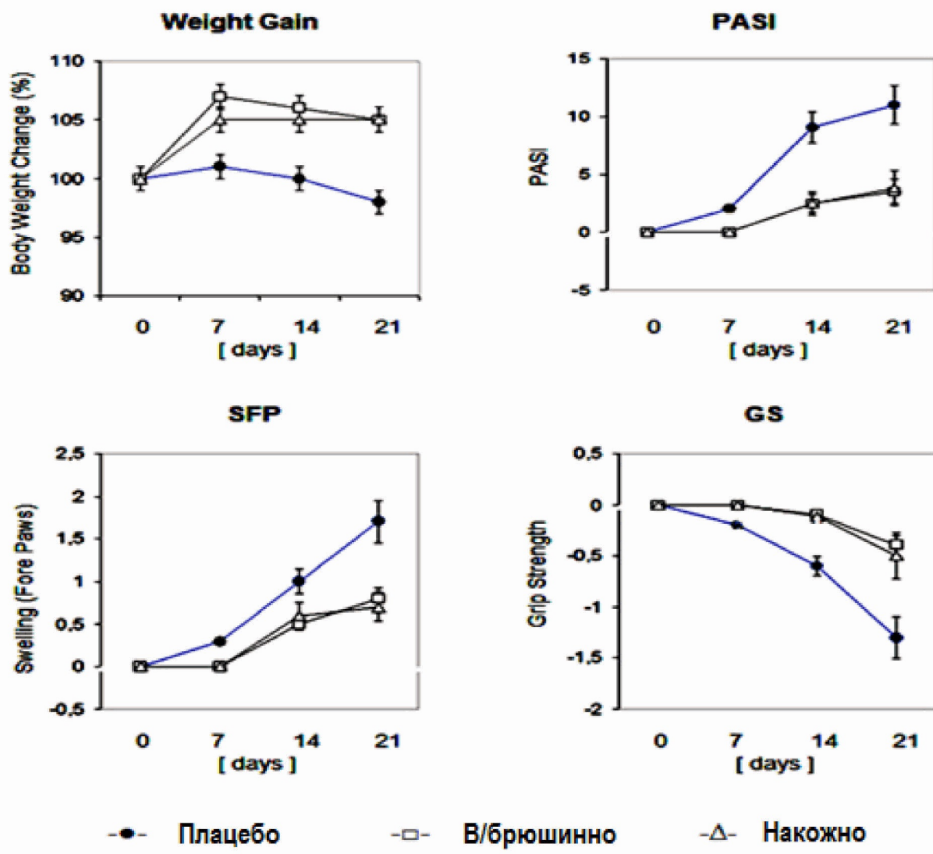
Фиг.2А

2

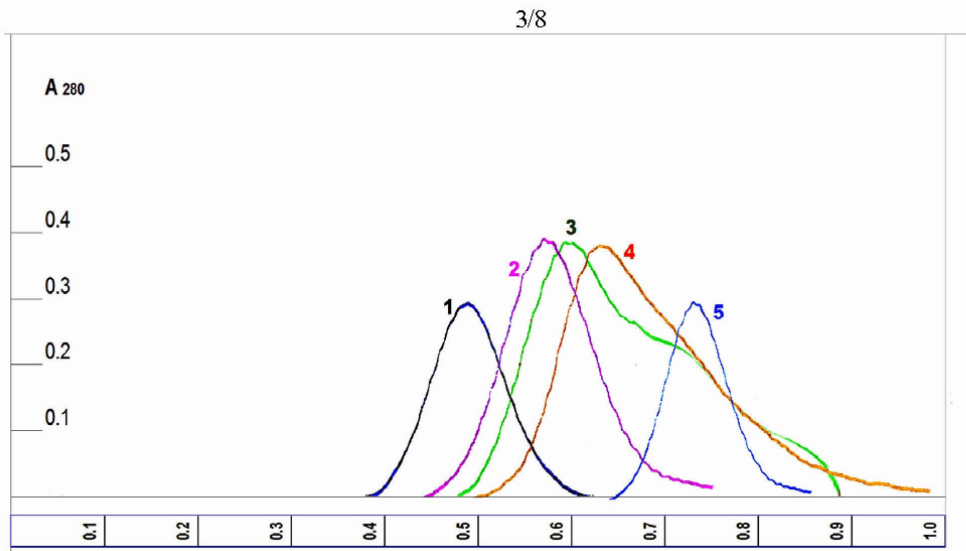
2/8



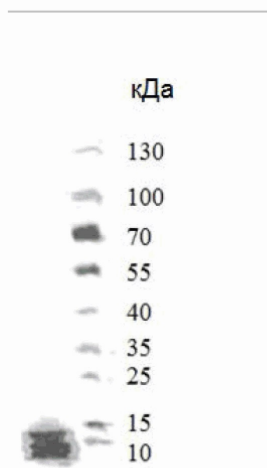
Фиг.2В



Фиг.2С

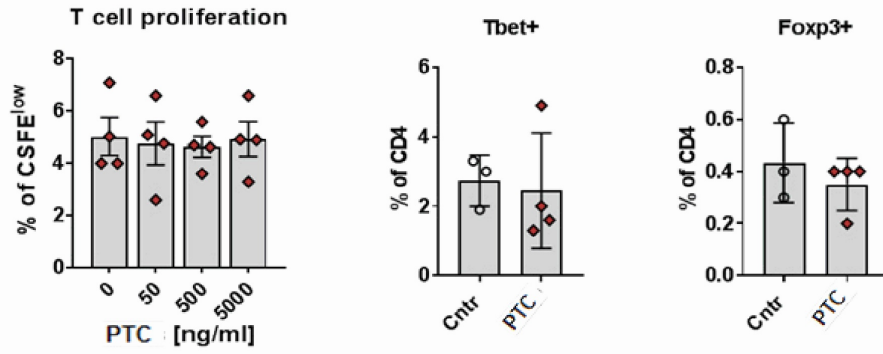


Фиг.3А

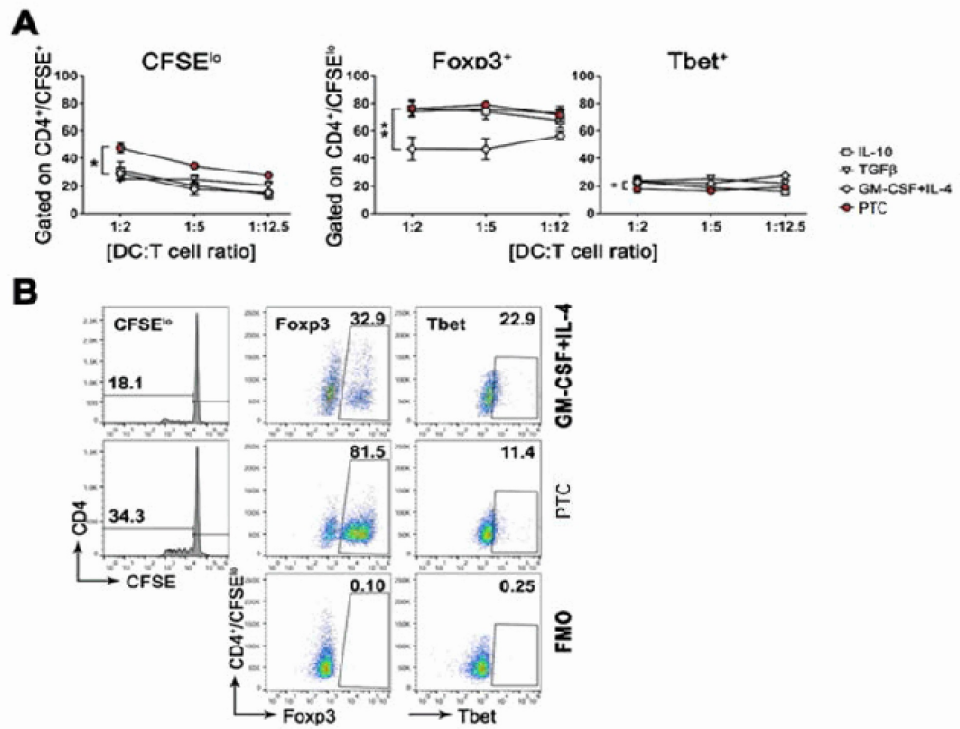


Фиг.3В

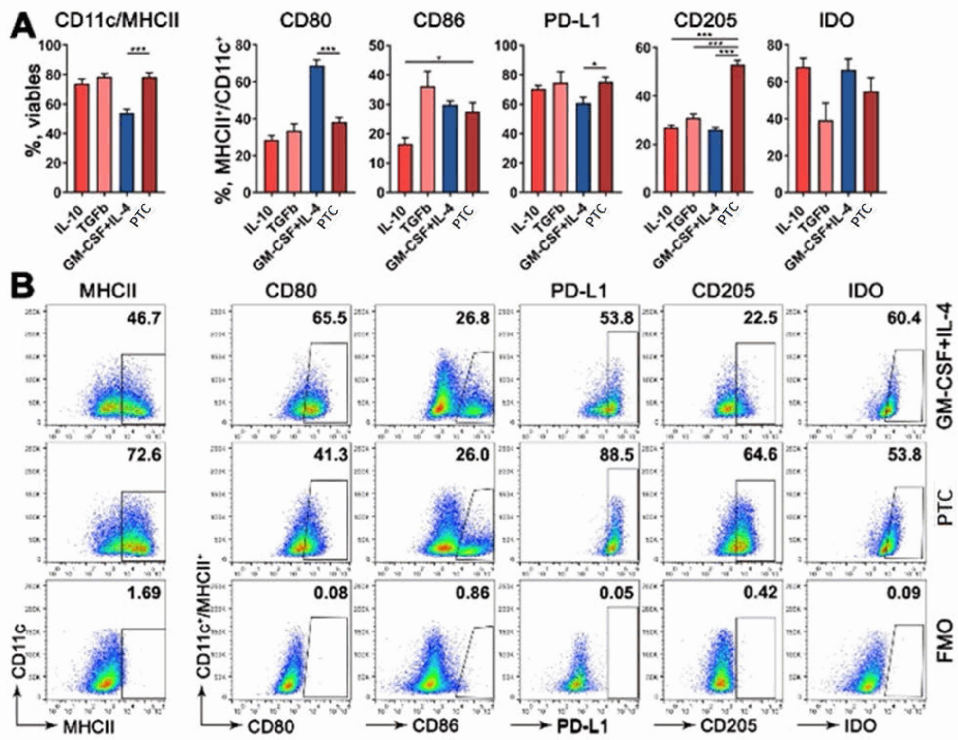
4/8



Фиг.4

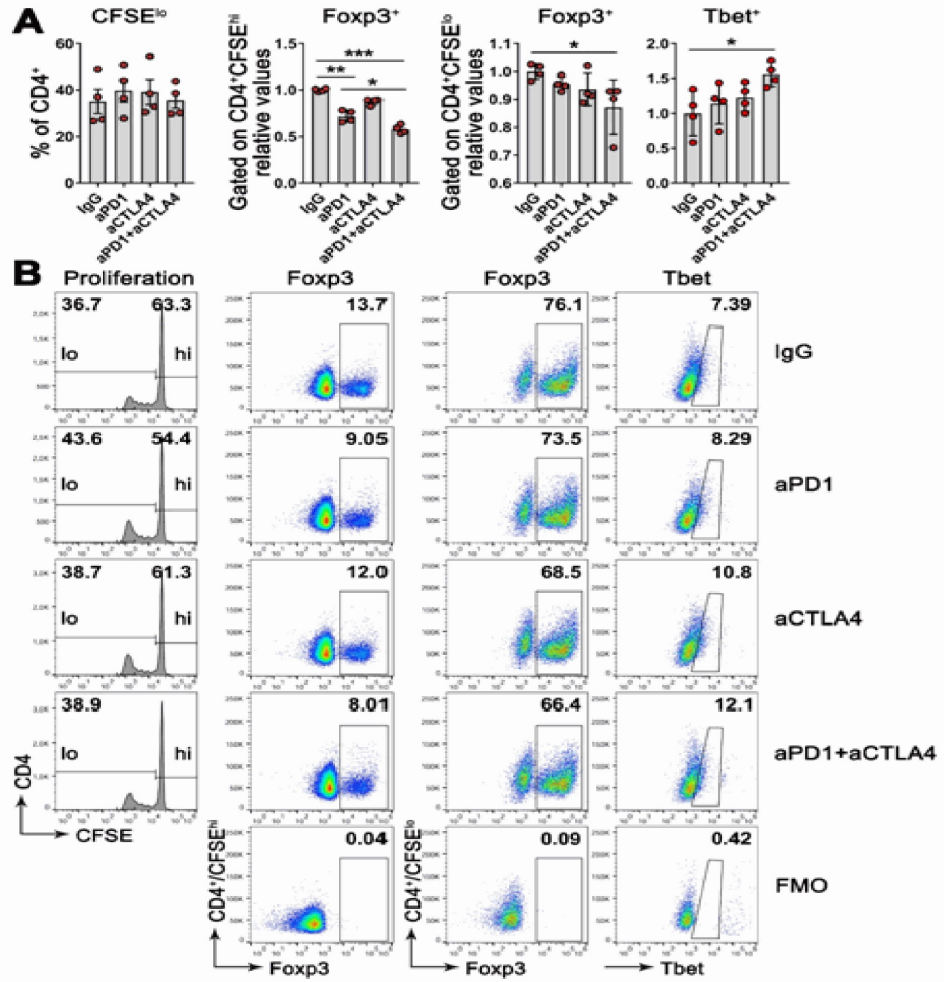


Фиг.5



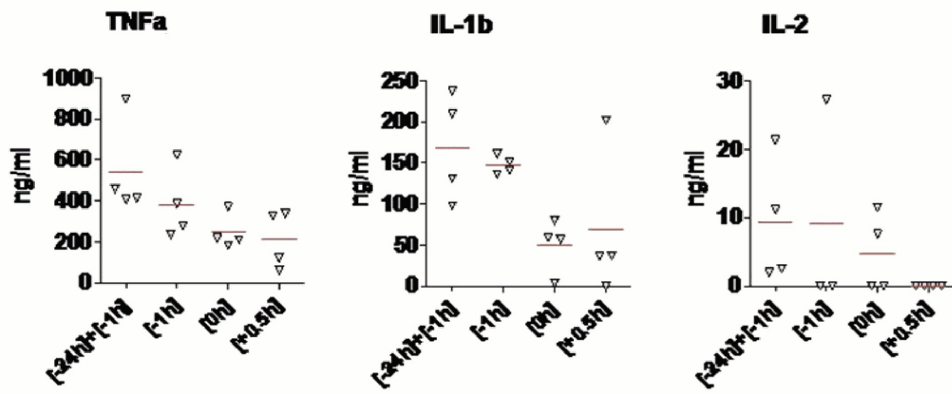
Фиг. 6

6.8

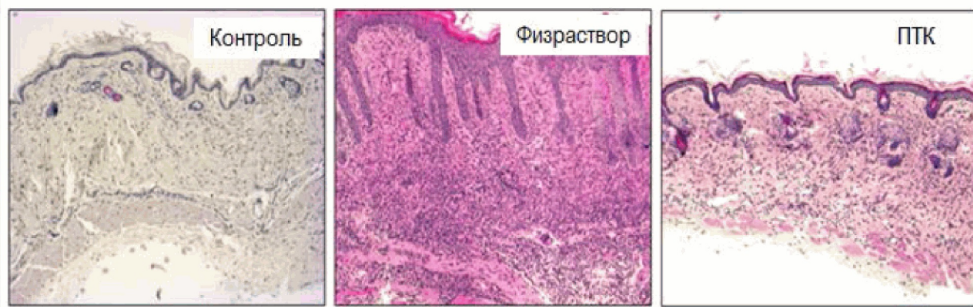


Фиг. 7

7/8

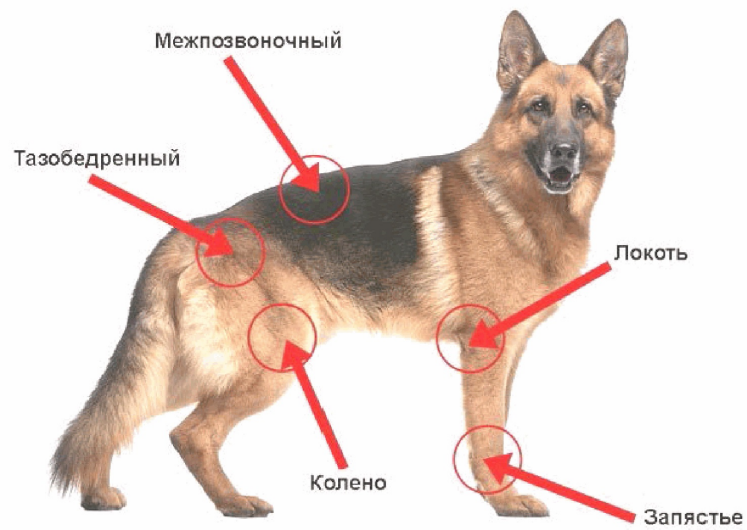


Фиг.8



Фиг.9

8/8



Фиг.10