



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **100739**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 31/01 (2006.01)

A61K 31/047 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 15106	(72) Винахідник(и):	Кусто Дідьєс (FR), Дюплан Елен (FR)
(22) Дата подання заявки:	18.05.2009	(73) Власник(и):	ПЬЄР ФАБР ДЕРМО-КОСМЕТИК, 45, Place Abel Gance, F-92100 Boulogne- Billancourt, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.01.2013	(74) Представник:	Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	0853185	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	KAMPF GUNTER ET AL: "Regular use of a hand cream can attenuate skin dryness and roughness caused by frequent hand washing" BMC DERMATOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 13 fevrier 2006 (2006-02-13), page 1-5 EP 0133151 A 13.02.1985
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16.05.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	FR		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.03.2011, Бюл.№ 6		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.01.2013, Бюл.№ 2		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2009/056007, 18.05.2009		

(54) ПОМ'ЯКШУЮЧА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ПРЕВЕНТИВНОГО ВПЛИВУ ПРИ АТОПІЧНОМУ ДЕРМАТИТІ

(57) Реферат:

Винахід стосується композиції для місцевого застосування, що містить як активний інгредієнт комбінацію гліцерину, вазеліну й вазелінового масла у формі емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі, призначена для запобігання atopічному дерматиту.

UA 100739 C2

Даний винахід належить до галузі atopії та лікування асоційованих з нею уражень.

Атопія визначається як спадкова схильність до реакцій на симптоматичному рівні (як захворювання) на різні алергени, такі як домашній пилок, кліщі, пилок, вовна тварин і т.д. Ураження, що вважаються atopічними, включають atopічний дерматит (AD), алергічну

5 бронхіальну астму й алергічний риніт, або "поліноз".

Атопічний дерматит (або atopічна екзема) є дерматологічним захворюванням, що часто зустрічається, уражає 10-15 % дітей молодшого віку у Франції, і ця кількість збільшувалася протягом останніх десятиліть.

10 Атопічний дерматит є хронічним захворюванням, розвиток якого супроводжується висипаннями, що перериваються періодами ремісії, протягом яких завжди присутні, але в мінімальній кількості, ділянки ураження, що проявляються, головним чином, у вигляді ксерозу (сухості шкіри) та сверблячки.

Запалення шкіри характеризується висипаннями, що проявляються у вигляді запальних ознак та симптомів, які включають червоні плями (еритему), пухирці, кірки, ексудацію та

15 коросту.

Як правило, дане захворювання виникає у віці від 3 місяців до 2 років, але може початися навіть раніше, у віці від 1 місяця. Його розвиток протікає за сприятливим сценарієм з повною ремісією, у більшості випадків спостережуваною у віці від 5 до 8 років. Можливе поновлення захворювання у підлітковому або молодіжному віці. У 15-20 % випадків захворювання може

20 залишатися у зрілому віці.

Також можливий розвиток убик іншого atopічного ураження. Наявність AD у дитячому віці збільшує ризик розвитку астми, та існує чітка кореляція між частотою виникнення AD й частотою виникнення астми. Ризик виникнення астми у дитини, що страждає AD, становить приблизно 30-40 %.

25 Ризик виникнення харчової алергії, що найчастіше починається у віці до 3 років, або алергічного риніту, що виникає пізніше, у різних дослідженнях оцінений по-різному.

Що стосується atopічного дерматиту, то існує виражена генетична схильність із ризиком розвитку захворювання 30-50 %, якщо захворюванням уражений один з батьків, та з ризиком, близьким до 80 %, якщо уражені обидва батьки. Генетична схильність обумовлена великою

30 кількістю генів, що кодують або детермінанти, пов'язані з захисною функцією епідермісу, або фактори, відповідальні за вроджений або надбаний імунітет. Враховуючи численні останні дослідження, можна прийняти як аксіому, що AD (або інші подібні atopічні захворювання) пов'язані з первинним порушенням захисної функції епідермісу, відповідальним за підвищення проникності для агентів навколишнього середовища (алергенів та мікроорганізмів),

35 відповідальних за імунологічну активацію та алергічні симптоми.

Порушення проникності епідермісу проявляються у вигляді ксерозу шкіри та у збільшенні невідчутних втрат води, і є підтвердженням поліморфізму генів, що кодують епідермальні білки, такі як філагрин (FLG), які беруть участь у захисній функції епідермісу (Palmer, 2006). Нещодавнє дослідження у Франції підтверджує зв'язок поліморфізму гена FLG з AD, з відносним

40 ризиком, що перевищує 3 (Hubiche, 2007).

Атопію можна розглядати як запізнілу реакцію гіперчутливості при контакті з алергенами навколишнього середовища. Як правило, вона проявляється у двох фазах. Під час першої, клінічно безсимптомної фази сенсibilізації, утворюються специфічні для шкіри Т-лімфоцити. Ця сенсibilізація відбувається унаслідок полегшеного ксерозом проникнення алергенів з

45 навколишнього середовища в шкіру. Друга фаза активації специфічних Т-лімфоцитів викликає продукування прозапальних цитокінів.

У цілому, зовнішні ознаки atopічного дерматиту є результатом складних взаємодій між факторами навколишнього середовища, фармакологічних порушень, дисфункцій або змін захисних функцій шкіри, імунологічних процесів та генетичної схильності.

50 Очевидно, серед численних факторів у хронічному характері патології відіграють роль шкірна гіперреактивність, неналежна імунна відповідь на різні мікроорганізми, а також вторинні інфекції.

Стає дедалі більш відомою роль шкірної флори у виникненні та/або підтриманні активації імунної системи, що сприяє розвитку екзематозних уражень. Зміна захисної функції шкіри пов'язана з певним імунодефіцитом у пацієнтів, уражених atopічним дерматитом, обумовленим колонізацією штамом *Staphylococcus aureus*, який колонізує шкіру 90 % пацієнтів з AD, навіть без прогресуючих висипань при даному захворюванні (Current Opinion in Allergy and Clinical Immunol. 2007, 7,413).

60 Існує кореляція між тяжкістю захворювання та щільністю колонізації стафілококами, з одного боку, та позитивною пробою на специфічні IgE (імуноглобуліни E) проти токсинів стафілококів, з

іншого боку (J. Allergy Clin. Immunol. 2006, 117, 1141; Am. J. Clin. Dermatol., 2006, 7, 273; Clin. Rev. Allergy Immunol., 2007, 33, 167; Current Opinion Allergy and Clinical Immunol. 2004, 4, 373).

Ці факти дозволяють припустити, що золотистий стафілокок відіграє роль у розвитку місцевої активації імунної системи, відповідальної за проявлення зовнішніх ознак atopічного дерматиту на шкірі і, можливо, алергійної сенсibiliзації.

Крім розчісування, існує багато факторів, що стимулюють колонізацію *Staphylococcus aureus* шляхом зміни системи первинного захисту шкіри, насамперед, шляхом зміни ліпідного складу рогового шару. Таким чином, дана зміна захисної функції шкіри відповідальна за колонізацію стафілококами, а також за збільшення втрати шкірою води, що викликає ксероз, подразнення, коросту, утворюючи тим самим різновид психопатологічного порочного кола.

Терапевтичне лікування atopічного дерматиту може бути розглянуте на різних рівнях, головним чином на симптоматичному рівні, але також і на профілактичному рівні. На сьогодні немає жодного куративного лікування даного захворювання.

Крім усунення ідентифікованих алергенів, яке є по можливості бажаним, доповненням до симптоматичного лікування висипань із застосуванням місцевої кортикотерапії, що вважається стандартною терапією цього захворювання, є зволоження шкіри, як засіб відновлення або підтримання її захисної ролі. Для лікування висипань також можна використовувати інші місцеві нестероїдні протизапальні агенти (зокрема, інгібітори кальциневрину). І нарешті, на випадок тяжких форм захворювання, резервними є фототерапія, пероральні імуносупресори, або інші екстенсивні системні терапії.

Однак, застосування кортикоїдів, протизапальних засобів та/або імуносупресорів, навіть шляхом місцевого введення, зокрема, дітям молодшого або ясельного віку, не є тривіальним, викликає небажані ефекти і є тільки лише симптоматичним лікуванням.

З іншого боку, існує боязнь застосування кортикоїдів, що не полегшує лікування цього захворювання та не сприяє дотриманню пацієнтами режиму терапії, який часто не витримується.

Нарешті, *Staphylococcus aureus* можуть викликати резистентність до кортикоїдів (Clin. Rev. Allergy Immunol. 2007, 33, 167).

Таким чином, існує необхідність та величезна потреба у терапевтичних альтернативах та, конкретніше, у превентивних лікуваннях. Ці лікування мають за мету зниження частоти виникнення та/або інтенсивності екзематозних висипань, що спостерігаються у пацієнтів, уражених atopічним дерматитом. Згідно з визначенням ВООЗ (Всесвітньої організації охорони здоров'я), цей підхід є третинним превентивним актом, оскільки він спрямований на те, щоб уникнути ускладнень (запальних висипань) захворювання (atopічного дерматиту), яке вже існує.

У заявці WO2008048076 описане застосування глюкозаміну, або одного з його похідних для лікування atopічного дерматиту.

У заявці WO2007023226 описане застосування пробіотики, об'єднаного з пребіотиком, для лікування atopічного дерматиту у дітей.

У ході даної роботи було помічено, що досить дивно та несподівано комбінація гліцерину, вазеліну[®] й вазелінового масла, у формі емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі, уможливило запобігання atopічного дерматиту.

Автори винаходу продемонстрували інгібуючий ефект цієї комбінації на адгезію *Staphylococcus aureus* до кератиноцитів у культурі. Таким чином, комбінація гліцерину, вазеліну й вазелінового масла уможливило запобігання інфікуючій дії *Staphylococcus aureus* у пацієнтів з atopією, а також їх впливу у підтриманні запальної реакції, шляхом утворення специфічних IgE, інгібуючих колонізацію шкіри мікроорганізмами *Staphylococcus aureus*.

Крім того, автори винаходу продемонстрували, що ця комбінація відновлює захисну й функціональну ізолюючу роль шкіри. Для цього автори винаходу використовували модель індукованого зневоднювання шкіри *ex vivo*. Крім того, вони контролювали експресію епідермальних маркерів та активність серинових протеаз.

Отже, задачею даного винаходу є композиція для місцевого застосування, що містить як активний інгредієнт комбінацію гліцерину, вазеліну й вазелінового масла у вигляді емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі, з метою її застосування для запобігання atopічного дерматиту.

Краще, щоб це запобігання було запобіганням первинного типу.

У рамках даного винаходу терміни "запобігають", "запобігання" або "превентивне лікування" означають запобігання виникненню захворювання, розладу або однієї чи декількох ознак та/або симптомів.

У рамках даного винаходу термін "первинне запобігання" або "первинне превентивне лікування" означає запобігання виникненню atopічних захворювань (atopічного дерматиту та/або алергійної бронхіальної астми та/або алергійного риніту, звичайно називаного

"полінозом") та/або алергійної сенсibiliзації, шляхом виявлення дії до появи перших клінічних ознак атопії, тобто до початку захворювання.

У рамках даного винаходу комбінація гліцерину, вазеліну та вазелінового масла у вигляді емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі буде називатися "активною комбінацією".

5 Краще, коли гліцерин, вазелін та вазелінове масло задовольняють критеріям, що описуються та контролюються відповідно до "Європейської фармакопеї" 6-го видання.

Краще, коли вазелін активної комбінації має температуру краплепадіння, що становить від 35 до 70 °C, краще, становить від 51 до 57 °C, ще краще - приблизно 54 °C. Температуру краплепадіння вимірюють відповідно до методу 2.2.17, описаного у "Європейській фармакопеї" 6-го видання.

10 Краще, коли вазелін активної комбінації має консистенцію, що становить від 175 до 195 1/10 мм, краще - приблизно 185 1/10 мм (конусна penetрація при 25 °C).

Краще, коли вазелін активної комбінації має в'язкість, що становить від 4 до 5 сСт (сантистокс) при 100 °C, краще - приблизно 4,8 сСт при 100 °C.

15 У композиціях за винаходом частка активної комбінації становить від 10 до 50 %, і краще від 20 до 30 % маси в розрахунку на загальну масу композиції; концентрація гліцерину становить від 5 до 30 %, краще, від 10 до 20 %, і ще краще, становить приблизно 15 % маси в розрахунку на загальну масу композиції; концентрація вазеліну становить від 3 до 20 %, краще, від 5 до 10 %, і ще краще, становить приблизно 8 % маси в розрахунку на загальну масу композиції, а концентрація вазелінового масла становить від 0,5 до 5 %, краще, від 1 до 3 %, і ще краще, становить приблизно 2 % маси в розрахунку на загальну масу композиції.

У водній фазі вода становить від 30 до 80 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

20 Краще, композиція за винаходом містить приблизно 15 % гліцерину, приблизно 8 % вазеліну, та приблизно 2 % вазелінового масла по масі, в розрахунку на загальну масу композиції.

25 Дерматологічна композиція за винаходом додатково містить стандартні дерматологічно сумісні ексципієнти.

Дерматологічна композиція за даним винаходом може бути виготовлена у вигляді емульсії типу масло-у-воді (W/O) або вода-у-маслі (O/W), у вигляді множинної емульсії, такої як, 30 наприклад, емульсія типу вода/масло/вода (W/O/W) або емульсія типу масло/вода/масло (O/W/O), або також у вигляді гідродисперсії чи ліподисперсії, гелю чи аерозолю.

Дерматологічно сумісними ексципієнтами може бути будь-який ексципієнт з ексципієнтів, відомих фахівцеві у даній галузі техніки, для виготовлення композиції для місцевого застосування у вигляді крему, лосьйону, гелю, мазі, емульсії, мікроемульсії, спрею і т.д.

35 Зокрема, композиція за винаходом може містити домішки та допоміжні речовини до композицій, такі як емульгатори, загусники, гелетвірні агенти, вологоутримуючі агенти, агенти, що підсилюють розтікання, стабілізатори, барвники, ароматизатори та консерванти.

Придатні емульгатори включають стеаринову кислоту, троламін, ПЕГ-40-стеарат.

40 Краще, композиція за винаходом містить приблизно 5 % емульгаторів по масі, в розрахунку на загальну масу композиції.

Краще, композиція за винаходом містить від 1 до 5 % стеаринової кислоти, краще - приблизно 3 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

Краще, композиція за винаходом містить від 0 до 2 % троламіну, краще - приблизно 0,5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

45 Краще, композиція за винаходом містить від 0 до 2 % ПЕГ-40-стеарату, краще - приблизно 0,5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

Придатні загусники включають гліцерину моностеарат, ПЕГ. Краще, композиція за винаходом містить приблизно 5 % загусників по масі, в розрахунку на загальну масу композиції.

50 Краще, композиція за винаходом містить від 2 до 10 % гліцерину моностеарату, краще - приблизно 5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

Придатні консерванти включають пропіл-парагідроксибензоат, хлоркрезол. Краще, композиція за винаходом містить приблизно 0,1 % консервантів по масі, в розрахунку на загальну масу композиції.

55 Краще, композиція за винаходом містить від 0,05 до 1 % пропіл-парагідроксибензоату, краще - приблизно 0,1 %, в розрахунку на загальну масу композиції.

Придатні агенти, що посилюють розтікання, включають диметикон, полідиметилциклосилоксан.

Краще, композиція за винаходом містить приблизно 2 % по масі агентів, що посилюють розтікання, в розрахунку на загальну масу композиції.

Краще, композиція за винаходом містить від 0,2 до 2 % диметикону, краще - приблизно 0,5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

Краще, композиція за винаходом містить від 1 до 3 % полідиметилциклосилоксану, краще - приблизно 2,5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

5 Придатні вологоутримуючі агенти включають поліетиленгліколь, краще - поліетиленгліколь 600.

Краще, композиція за винаходом містить приблизно 8 % вологоутримуючих агентів по масі, в розрахунку на загальну масу композиції.

10 Краще, композиція за винаходом містить від 2 до 10 % поліетиленгліколю, краще - приблизно 5 % мас, в розрахунку на загальну масу композиції.

Водою, використовуюваною для водної фази емульсії, може бути дистильована вода або термальна вода, що має дермато-косметичні властивості.

Краще, композиція за винаходом містить:

- 15 - приблизно 15 % гліцерину,
- приблизно 8 % вазеліну,
- приблизно 2 % вазелінового масла, та як ексципієнти:
- приблизно 1-5 % стеаринової кислоти,
- приблизно 2-10 % гліцерину моностеарату,
- 20 - приблизно 1-3 % полідиметилциклосилоксану,
- приблизно від 0,2 % до 2 % диметикону,
- приблизно 2-10 % поліетиленгліколю 600,
- приблизно 0-2 % троламіну,
- приблизно 0,05-1 % пропіл-парагідроксибензоату,
- воду до 100 %.

25 Крім того, даним винаходом вирішується задача застосування композиції за винаходом для виготовлення лікарського засобу, призначеного для запобігання atopічного дерматиту.

Даний винахід проілюстрований наведеними далі прикладами.

Приклади

Приклад 1. Композиції

30 Композиція А

- 15 г гліцерину,
- 8 г вазеліну,
- 2 г вазелінового масла,
- 0,5 г троламіну,

35 - та як ексципієнти: стеаринова кислота, гліцерину моностеарат, полідиметилциклосилоксан, диметикон, поліетиленгліколь (ПЕГ) 600, пропіл-парагідроксибензоат,

- вода до 100 г.

Композиція А'

- 40 - 15 г гліцерину,
- 8 г вазеліну,
- 2 г вазелінового масла,
- 1,5 г стеаринової кислоти,
- 5 г гліцерину моностеарату,
- 45 - 1,5 г полідиметилциклосилоксану,
- 0,5 г диметикону,
- 5 г поліетиленгліколю 600,
- 0,15 г троламіну,
- 0,1 г пропілпарагідроксилбензоату,
- вода до 100 г.

50 Композиція В

- 15 г гліцерину,
- 8 г вазеліну,
- 2 г вазелінового масла,
- 0,5 г ПЕГ-40-стеарату,

55 - і як ексципієнти: стеаринова кислота, гліцерину моностеарат, полідиметилциклосилоксан, диметикон, поліетиленгліколь (ПЕГ) 600, хлоркрезол,

- вода до 100 г.

Композиція В'

- 60 - 15 г гліцерину,
- 8 г вазеліну,

- 2 г вазелінового масла,
- 3 г стеаринової кислоти,
- 5 г гліцерину моностеарату,
- 2 г полідиметилциклосилоксану,
- 0,5 г диметикону,
- 0,1 г троламіну,
- 3 г поліетиленгліколю 600,
- 0,5 г ПЕГ-40-стеарату,
- 0,075 г хлоркрезолу,
- вода до 100 г.

Приклад 2: Тест на цитотоксичність
Принцип

Принцип тесту оснований на ферментативному перетворенні солі тетразолію, "натрієвої солі 3,3-[1-[(феніламіно)карбоніл]-3,4-тетразолій-біс(4-метокси-6-нітро)]-бензолсульфонової кислоти гідрату", тобто ХТТ, на забарвлений продукт формаза.

ХТТ відновлюється під дією мітохондріальної дегідрогенази живих клітин у присутності донора електронів, коферменту Q, до водорозчинної сполуки формазану жовто-оранжевого забарвлення, що можна виміряти кількісно спектрофотометрично на 450 нм.

Оброблення продуктом

Засівають 96-лункові мікропланшети клітинами у кількості 10^5 /мл, через 24 години інкубації культуральне середовище видаляють і мікропланшети промивають PBS (фізіологічним розчином, забуференим фосфатом). До кожної лунки мікропланшетів додають по 100 мкл тестованого продукту в різних розведеннях. У таких саме умовах виготовляють контролю без будь-якого продукту.

Мікропланшети розміщують для проведення інкубації протягом 2 годин при 37 °C у атмосфері 5 % CO₂.

Виявлення цитотоксичності

Після інкубації мікропланшети двічі промивають PBS. Потім до кожної лунки 96-лункового планшета додають по 100 мкл суміші ХТТ (1 мг/мл)/коферменту Q (0,2 мг/мл).

Через 3 години інкубації до кожної лунки додають по 100 мкл 10 %-го розчину SDS (додецилсульфату натрію).

Негайне зчитування оптичної густини (OD) при 450 нм здійснюють з використанням спектрофотометра POLARstar (BMG, France).

Подання результатів

Виміряна оптична густина пропорційна кількості життєздатних клітин.

Таким чином, за допомогою цього тесту автори винаходу отримали можливість аналізувати на підставі порівняння з оптичною густиною, що відповідає контролю, клітинну цитотоксичність, коли оптична густина є меншою за таку в контрольній пробі:

$$\% \text{ життєздатності} = (\text{OD після обробки} - \text{OD контролю}) / \text{OD контролю} \times 100.$$

Продукт вважається токсичним, якщо відсоток життєздатності становить ≤ 30 %.

Внутрішні базові тести проводять 8 разів.

Результати

Залежно від ступеня нецитотоксичності продуктів для тесту на адгезію вибрані такі концентрації:

- композиція A: 6 %, 3 %, 1,5 %, 0,8 % і 0,4 %;
- Atopiclair®: 0,8 %, 0,4 %, 0,2 %, 0,1 % і 0,05 %;
- Physiogel®: 6 %, 3 %, 1,5 %, 0,8 % і 0,4 %;
- композиція B: 3 %, 1,5 %, 0,8 %, 0,4 % і 0,2 %.

Приклад 3. Тест на адгезію

Принцип

Введення мітки у бактерії з використанням міченого тритієм аденіну (Sigma) і визначення частки бактерій, що прикріпилися в результаті адгезії до поверхні кератиноцитів, шляхом оцінювання рівня радіоактивності.

Введення мітки у бактерії з використанням міченого тритієм аденіну

Введення мітки у бактерії здійснюють у присутності 30 мкКі міченого тритієм аденіну у відповідному культуральному середовищі. Після інкубації протягом 18 годин при 37 °C мікроорганізми промивають три рази в PBS для видалення не включеної радіоактивної мітки.

Суспензії доводять до 2×10^8 мікроорганізмів/мл у підтримувальному середовищі.

Ефект інгібування адгезії

На поверхню клітинного шару наносять по 500 мкл суспензії мічених бактерій у присутності кожного тестованого розведення продукту.

Через 2 години інкубації (37 °C, 5 % CO₂) виконують 3 промивання, використовуючи PBS.

5 Лізис клітин

Бактерії, що прикріпилися в результаті адгезії до кератиноцитів, лізують за допомогою 500 мкл 0,5 н. розчину гідроксиду натрію з 0,1 % додецилсульфату натрію протягом 18 годин при 37 °C.

10 З кожної лунки відбирають лізат, і поміщають у сцинтиляційні флакони. До кожного флакону додають по 2 мл рідкого сцинтилятора.

Подання результатів

Зняття показань здійснюють, використовуючи лічильник β-випромінювання, і результати виражають у вигляді рівню радіоактивності у срм (кількість імпульсів за хвилину).

Відсоток інгібування адгезії розраховують відповідно до формули:

15 $\% \text{ інгібування} = ((\text{срм у тесті} - \text{срм у контролі}) / \text{срм у контролі}) \times 100.$

Відсоток інгібування адгезії є істотним, якщо його величина становить $\leq -30 \%$.

Ці тести виконують у чотирьох повторах.

Висновок

20 - Композиція А значно інгібує адгезію *S. aureus* до кератиноцитів через 2 години інкубації при концентрації 6 % і 3 %.

- Продукт Physiogel значно інгібує адгезію *S. aureus* до кератиноцитів через 2 години інкубації при концентрації 6 %, але не при 3 %.

- Продукт Atopiclair не виявляє ніякого ефекту на адгезію *S. aureus* до кератиноцитів.

- У присутності композиції В адгезія *S. aureus* до кератиноцитів аномально підвищена.

25 Приклад 4: Аналіз регуляції індукованого зневоднювання шкіри

Тут автори винаходу оцінюють зволожуючу активність композиції А і подальше поліпшення захисної функції шкіри, використовуючи модель індукованого зневоднювання шкіри *ex vivo*.

Автори винаходу спостерігають за експресією різних молекулярних епідермальних маркерів за допомогою кількісної ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) та імуногістохімічного аналізу.

30 Крім цього, автори винаходу відстежують активність ферментів - серинових протеаз, використовуючи зимографію *in situ*, і деградацію десмосомальних білків рогової оболонки, використовуючи вестерн-блотинг.

Функціональність шкірного бар'єра аналізують, використовуючи флуоресцентні зонди.

Устаткування та методи

35 I. Моделі тканини

1. Підготовка експлантатів шкіри

Лабораторія отримує зразки шкіри з відходів після операцій пластичної хірургії (по зменшенню молочної залози). Використання цих зразків підпадає під "Декларацію про діяльність з консервації й препарування елементів людського тіла для потреб наукової програми групи П'єра Фабра" ("The declaration of an activity for preserving and preparing elements of the human body for the needs of a research program of the Pierre Fabre group"), затверджену міністерством вищої освіти й наукових досліджень Франції.

40 Ці зразки промивають у 10 промиваннях PBS, і потім за допомогою штамп висікають диски діаметром 2 см. Експлантанти шкіри розстилають на сітці в чашці Петрі та, щоб обмежити площу обробки, на шкіру герметично накладають кільце діаметром 1 см.

2. Кінетики моделей

Для індукування моделі зневоднювання шкіру сушать протягом 2 годин у витяжній шафі для клітинних культур у чашці без кришки, а потім поміщають до сушильної шафи на 2 години для місцевого оброблення у присутності, або за відсутності, будь-якої активної комбінації. 50 Негативний контроль зневоднювального стресу піддається такій самій кінетиці у закритій чашці Петрі.

3. Зразки для аналізу

Після обробки відбирають 2 зразки біоптату діаметром 6 мм для аналізу експресії РНК, а біоптат діаметром 4 мм поміщають у полімерний блок Tissue Tek® (Sakura Finetek) для гістологічного дослідження. Для аналізу білка шкіру піддають впливу теплового шоку у водяній бані при 60 °C протягом 5 хвилин, і потім при 4 °C протягом 2 хвилин, щоб відокремити епідерміс від дерми.

Біоптати й зразки епідермісу заморожують у рідкому азоті та зберігають при -80 °C до проведення аналізу.

60

II. Аналіз транскриптому за допомогою кількісної ПЛР

Шкірні біопрати подрібнюють у ступці, заздалегідь охолодженій рідким азотом, і РНК екстрагують, використовуючи набір RNeasy® (QIAGEN) відповідно до рекомендацій постачальника. Потім РНК аналізують з використанням Bioanalyzer 2100® (Agilent Technologies) на РНК-чипах 6000 Nano Labchip®. Отримують кДНК з 1 мкг РНК за допомогою ферментативної реакції ретротранскрипції, проведеної з використанням набору Access RT-PCR Core Reagents® (Promega) з оліго-dT-праймерами. Рівні експресії генів аналізують шляхом кількісної ПЛР у флуоресцентному термоциклері iCycler iQ® (Biorad), використовуючи набори для ПЛР iQ™ з барвником супермікс зеленим SYBR® (Biorad) відповідно до процедури з 40 циклів, що включають денатурацію при 95 °C (15 с) та елонгацію при 60 °C (1 хв). Накопичення продукту ПЛР, пропорційне емісії флуоресценції (інтеркалюючий барвник SYBR®Green), спостерігають цикл за циклом, використовуючи програмне забезпечення iCycler.

Аналітичне програмне забезпечення iCycler, версія 3.1, видає наближені величини C_T (порогового циклу) - циклу, з якого починається реєстрація ампліфікації кДНК. Паралельно виконують аналіз експресії декількох генів порівняння, використовуючи програму Genorm, версію 3.4, що дозволяє відібрати найбільш стабільний ген порівняння для кожного зразка. Потім цей ген використовують як порівняльний для нормування результатів, розраховуючи $\Delta C_T = C_T$ гена, що становить інтерес - C_T гена порівняння.

Потім розраховують фактор індукції (IF) для кожної обробки по відношенню до відповідного контрольного стану. $IF = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, де $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ після обробки - ΔC_T контролю. Експресію мРНК оцінюють у двох повторах для п'яти експериментів для 5 різних індивідуумів. Якщо фактор індукції відносно контролю більший за 2, вважається, що експресія гена індуквана, а якщо менший за 0,5, вважається, що експресія репресована. Вплив активного начала на відповідь на стрес, викликуваний у моделі, оцінюють як відсоток інгібування, розрахований за такою формулою:

$$\% \text{ інгібування відповіді на стрес} = 100 \times \frac{((IF \text{ після стресу}) - (IF \text{ контролю за відсутності стресу})) - ((IF \text{ після обробки}) - (IF \text{ контролю за відсутності стресу}))}{((IF \text{ після стресу}) - (IF \text{ контролю за відсутності стресу}))}$$

У рамках досліджуваної моделі стан "контроль за відсутності стресу" відповідає контролю за відсутності сушіння; стан "після стресу" відповідає шкірному біопрату, який сушили протягом 2 годин, і який перебував 2 додаткових години в умовах контролю (тобто, без будь-якої місцевої обробки); і нарешті, стан "після обробки" відноситься до шкіри, яку протягом 2 годин піддавали сушінню, потім протягом 2 годин місцевої обробці пом'якшуючим засобом.

III. Аналіз білкової експресії вестерн-блотингом

Піддані обробці зразки епідермісу подрібнюють у ступці, охолодженій рідким азотом, та білки екстрагують у лізуючому буфері RIPA (Tris HCl, pH 8, 50 mM; NaCl, 150 mM; Тритон X 100 IX; дезоксихолат Na⁺, 1 %; SDS, 0,1 %; EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота), 5 mM; DTT (дитіотриїт), 100 mM; коктейль інгібіторів протеаз (номер посилання P8340, SIGMA).

Потім білки аналізують, використовуючи метод аналізу білків у присутності відновлювальних агентів та детергентів (RC-DC Protein Assay) (Biorad), і аналізують вестерн-блотингом. Для кожного стану на гелі, виготовлені у трис-гліциновому буфері, що містять 7,5 % поліакриламід, наносять по 25-40 мкг загального білка. Суміш білків розділяють електрофорезом, використовуючи систему Mini Protean II (Biorad), і білки переносять на мембрану PVDF (полівініліденфторид) (Hybond-P, Amersham). Білок, що становить інтерес, виявляють, використовуючи специфічне до нього антитіло й набір ECL+ (Amersham). Кількість білків і частку деградованої форми обчислюють, використовуючи програмне забезпечення Image Master TotalLab, версію 1.11 (Amersham), після нормування на β-актин (білок порівняння).

IV. Гістологічні методики

Шкірні біопрати розрізають, використовуючи кріотом (Leica CM 3050s), на зрізи товщиною 5 мкм і поміщають на предметні стекла для вивчення (Starfrost®).

1. Імуногістохімічний аналіз

Кріозрізи фіксують протягом 10 хвилин ацетоном при 20 °C, і потім регідрують PBS, перед проведенням аналізу за допомогою імуногістохімічного мічення. Після фіксації та регідрування проводять насичення шкірних зрізів 3 %-м розчином BSA (бичачого сироваткового альбуміну), та інкубують протягом 1 години з первинним антитілом до білка, що становить інтерес. У другій фазі їх інкубують протягом 1 години із вторинним антитілом, кон'югованим з флуорохромом Alexa-488 або Alexa-555, і остаточно закріплюють у мовіолі, що містить DAPI (4',6-діамідино-2-феніліндол) для мічення ядер.

2. Зимографія in situ

Після фіксації протягом 10 хвилин у ацетоні при -20°C зрізи промивають у промивальному розчині (1 %-ому Твіні 20 у воді) та інкубують протягом 2 годин при 37°C з розчином, який містить специфічний субстрат ферментів, що становлять інтерес, кон'югований з флуорофором (допоміжною речовиною). Коли фермент активується, флуорофор відщеплюється, випускаючи сигнал флуоресценції, який можна спостерігати під мікроскопом. Потім мічені предметні стекла розглядають під мікроскопом з епіфлуоресценцією (Nikon Eclipse 50i), або під інвертованим конфокальним мікроскопом Zeiss Axiovert 100.

3. Флуоресцентний зонд

Після зневоднювальної обробки експлантати шкіри додатково інкубують протягом двох годин в сушильній шафі при 37°C з флуоресцентним зондом дилітієвою сіллю карбоксигідрозиду люциферового жовтого барвника (Invitrogen) у концентрації 1 мМ у буфері HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, збалансований сольовий розчин Хенка). Після цього шкіру промивають у ванночці з HBSS протягом 1 хвилини, і потім відбирають зразки біоптатів діаметром 4 мм та поміщають у масу Tissue TekR[®] (Sakura Finetek) (Matsuki et al., 1998), що полімеризується. Потім шкіру розрізають, ядра маркують за допомогою DAPI і предметні стекла розглядають під флуоресцентним мікроскопом з довжиною хвилі 450 нм, як описано вище.

Результати

1. Модель порушення захисної функції індукованим висушуванням

1. Вимірювання проникності шкіри з використанням флуоресцентного зонда

Перший аналіз полягав у вивченні фундаментального функціонального параметра захисної функції шкіри: проникності верхніх шарів епідермісу. Інкубація шкіри з флуоресцентним зондом (люциферовим жовтим) після експерименту з висушуванням дозволила охарактеризувати зміну проникності шкіри. Для контрольних станів включення мітки є дуже низьким і поверхневим, зонд не проникає дуже сильно крізь роговий шар і видаляється у процесі промивання. Після двох годин висушування включення мітки спостерігається у глибших шарах рогового шару. Висушування робить шкіру більш проникною, її захисна функція погіршується. Місцева обробка композицією А після двох годин висушування відновлює непроникність SC (рогового шару) для зонда, включення мітки знову дуже низьке й поверхнєве, таке ж, як для контрольних станів. Через це можна зробити висновок, що зволожуюча обробка чинить відновлювальний ефект на висушену шкіру та на захисну функцію шкіри, які піддають експериментальній оцінці в даній моделі тканини.

2. Вплив на регуляцію транскриптому й протеому

Експресію різних генів, потенційно залучених у гомеостаз епідермальної захисної функції, вимірювали з використанням кількісної ПЛР в різних стресових станах і при різній обробці в моделі сушіння. Імуногістохімічний аналіз дав можливість показати перебудову експресії деяких білків в плані локалізації, наприклад, білків міжклітинних контактів. Аналіз деградації десмосомальних білків рогової оболонки проводили, використовуючи вестерн-блотинг.

Мішені, досліджені з використанням цих різних підходів, поєднували у групи відповідно по їх фізіологічній ролі (див. Таблицю 1). Мета даного дослідження полягає у виявленні відповіді на стрес, що піддається вимірюванню, і корекції даного ефекту стресу за допомогою місцевого застосування композиції А.

У виконаній роботі також виявилось можливим показати різні рівні регуляції визначених мішеней. Таким чином, автори винаходу були здатними помітити, що ферменти, які обумовлюють десквамацію, не регулюються на рівні транскрипції, а конкретніше, регулюються на рівні їх активності (порівн. результати 3).

Таблиця 1

Короткий опис мішеней і фармакологічної відповіді, дослідженої в моделі з висушуванням

Y = мішень дає відповідь у моделі Y = так,

X = мішень не дає відповіді у моделі X = ні

Мішень	Відповідь на стрес	Інгібування композицією А відповіді на стрес
Проникність шкіри	Y	Y
Десмоглеїн 1	Y	Y
Cdsn (корнеодесмозин)	X	X
Десмоколін	Y	Y
Плакоглобін	Y	X
KLK5 (калікреїн 5)	Y	X
KLK7	X	X
KLK8	X	X
Серинові протеази	Y	Y
Катепсин D	X	X
ABCA12 (АТФ-зв'язувальна касета, член 12 підсімейства А)	Y	Y
ABCG1 (АТФ-зв'язувальна касета, член 1 підсімейства G)	X	X
B-GC	X	X
DES 2	X	X
Філагрин	Y	Y
Інволюкрин	X	X
TG1	X	X
TG3	X	X
Каспаза 14	X	X
Elox-3 (епідермальна ліпоксигеназа 3)	Y	X
12R-LOX (12R-ліпоксигеназа)	X	X
HAS 2	Y	X
CD44 (фактор диференціювання 44)	X	X
AQP3 (аквапорин 3)	Y	Y
NHE1 (Na ⁺ /H ⁺ обмінник типу 1)	Y	Y
IL-1a (інтерлейкін-1a)	Y	Y
Оклюдин	Y	Y
Клаудин 1	Y	Y
Клаудин 4	Y	Y
ZO-1 (zonula occludence-1)	X	X
Е-Кадгерин	X	X
β-Катенін	X	X

3. Вимірювання ферментативної активності, що має відношення до десквамації

- Активність серинових протеаз оцінювали з використанням зимографії *in situ* на моделі зневоднювання, та спостерігали з використанням конфокального мікроскопа в контрольних станах після двох годин висушування, та після двох годин висушування з подальшою інкубацією з композицією А протягом двох годин. Включення мітки інтенсивніше у контрольних станах, воно відповідає нормальній сильній активності. Це включення мітки зменшується та стає нерівномірним уздовж рогового шару після двох годин висушування, у той час як його інтенсивність посилюється, і локалізація активності перетворюється після двох годин інкубації з композицією А. Висушування впливає на зменшення та порушення ферментативної активності. Ці результати узгоджуються зі зменшенням деградації десмосомальних білків рогової оболонки, яку автори винаходу спостерігають при висушуванні, і підтверджують вплив висушування на зменшення десквамації, спостережуване у розробленій моделі. Композиція А здатна відновлювати ферментативну активність зневодненої шкіри, що підтверджує вплив цієї композиції на відновлення гомеостазу десквамації.

Ці результати показують, що застосування композиції А дозволяє відновити рівень експресії молекулярних мішеней, експресія яких підвищується під дією стрес-індукованого зневоднювання шкіри. За допомогою композиції А також можливе відновлення активності серинової протеази. Крім того, місцеве застосування композиції А дозволяє здійснити супресію стрес-індукованого запалення.

У цілому, ці результати дозволяють припустити, що композиція А при місцевому застосуванні дозволяє відновити захисну функцію шкіри, обмежити, або навіть попередити колонізацію золотистим стафілококом, і таким чином вона є "первинним превентивним лікуванням", що попереджає виникнення atopічних захворювань (atopічного дерматиту, та/або алергійної бронхіальної астми, та/або алергійного риніту, звичайно називаного "полінозом"), та/або алергійних сенсibiliзацій.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція для місцевого застосування, що містить як активний інгредієнт комбінацію гліцерину, вазеліну та вазелінового масла у вигляді емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі, для її застосування у запобіганні atopічному дерматиту.
2. Композиція за п. 1 для її застосування у первинному запобіганні atopічному дерматиту.
3. Композиція за п. 1 або 2, де вазелін має температуру краплепадіння, що становить від 35 до 70 °C.
4. Композиція за п. 3, де вазелін має температуру краплепадіння, що становить від 51 до 57 °C, зокрема 54 °C.
5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, де вазелін має консистенцію, що становить від 175 до 195 1/10 мм (конусна penetрація при 25 °C).
6. Композиція за п. 5, де вазелін має консистенцію приблизно 185 1/10 мм (конусна penetрація при 25 °C).
7. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, де вазелін має в'язкість, що становить від 4 до 5 сСт при 100 °C.
8. Композиція за п. 7, де вазелін має в'язкість приблизно 4,8 сСт при 100 °C.
9. Композиція за будь-яким з пп. 1-8, яка містить приблизно 15 % гліцерину, приблизно 8 % вазеліну та приблизно 2 % вазелінового масла.
10. Композиція за будь-яким з пп. 1-9, яка містить один чи більше ексципієнтів, вибраних з групи, що складається зі стеаринової кислоти, гліцерину моностеарату, полідиметилциклоسیлоксану, диметикону, поліетиленгліколю 600, троламіну, пропілпарагідроксибензоату, дистильованої води.
11. Застосування композиції, що містить як активний інгредієнт комбінацію гліцерину, вазеліну та вазелінового масла у вигляді емульсії типу масло-у-воді або вода-у-маслі, для виготовлення ліків, призначених для запобігання atopічному дерматиту.
12. Застосування композиції за будь-яким з пп. 3-10 для виготовлення ліків, призначених для запобігання atopічному дерматиту.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601