

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391743** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.28**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.16**

(51) Int. Cl. *A61P 29/00* (2006.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)  
*A61P 17/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 37/08* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА,  
ОПОСРЕДОВАННОГО ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫМИ СИНОВИОЦИТАМИ**

---

(31) **63/126,920**

(32) **2020.12.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/063689**

(87) **WO 2022/133020 2022.06.23**

(71) Заявитель:  
**САМИ-САБИНСА ГРУП ЛИМИТЕД  
(IN)**

(72) Изобретатель:  
**Маджид Мухаммед (IN),  
Нагабхушанам Кальянам (US),  
Мундкур Лакшми (IN)**

(74) Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

---

(57) Раскрытое изобретение относится к способу и композициям для применения в ингибировании пролиферации, миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта. Изобретение также раскрывает композицию и способ регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток. Описанная композиция содержит 20-50% ВДМС (бисдеметоксикуркумин), 10-25 мас.% ДМС (деметоксикуркумин) и 30-50 мас.% куркумина, дополнительно содержащая босвеллиевые кислоты и полисахариды в диапазоне 35-50 и 35-45 мас.%.

**A1**

**202391743**

**202391743**

**A1**

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО  
АРТРИТА, ОПОСРЕДОВАННОГО ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫМИ  
СИНОВИОЦИТАМИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка PCT, испрашивающая приоритет по предварительной заявке США № 63126920, поданной 17 декабря 2020 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение в основном относится к способу и композициям для применения в ингибировании пролиферации, миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта. Изобретение также раскрывает композицию и способ регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток. Еще более конкретно, изобретение раскрывает композицию, содержащую 20-50% ВДМС (бисдеметоксикуркумин), 10-25 мас.% ДМС (деметоксикуркумин) и 30-50 мас.% куркумина, дополнительно содержащую босвеллиевые кислоты и полисахариды из *Boswellia serrata*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[Пар. 0001] Клиническое проявление ревматоидного артрита (РА), аутоиммунного синовиального заболевания, вызванного сложным взаимодействием генетических факторов и факторов окружающей среды, вызванного синовиальным воспалением и повреждением суставов. Фибробластоподобные синовиоциты (FLS) представляют собой мезенхимальные клетки, расположенные внутри суставов синовиальной оболочки, мягких тканей, выстилающих пространство диартродиальных суставов, сухожильных влагалищ и синовиальной сумки (Nygaard, G., Firestein, G.S. Восстановление синовиального гомеостаза при ревматоидном артрите путем нацеливания на фибробластоподобные синовиоциты. *Nat Rev Rheumatol* 16, 316–333 (2020)). FLS во внутреннем интимальном синовиальном слое играет ключевую роль в выработке цитокинов, которые увековечивают воспаление, и протеаз, способствующих разрушению хряща. Внутренний интимальный слой состоит из двух типов клеток, типа А или макрофагоподобных синовиальных клеток и типа В или FLS. Роль FLS, которая находится во внутреннем интимальном синовиальном слое, заключается в контроле состава внеклеточного матрикса (ECM) и синовиальной жидкости для смазывания и питания поверхностей хряща. Различные исследования показали, что при РА клетки типа А преимущественно продуцируют провоспалительные цитокины, хемокины и факторы роста, что, в свою

очередь, активирует местные FLS и индуцирует продукцию IL-6, простаноидов и матриксных металлопротеиназ (MMP). Этот процесс вызывает разрушение внеклеточного матрикса, активируемое аутокринной/паракринной сетью, для продления синовита. Также задокументировано, что RA способствует выживанию FLS, предотвращая делецию посредством апоптоза (Bartok B, Firestein GS: Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010; 233:233-255). Баланс между регуляторными Т-клетками (Т-рег)/Т-хелперами 17 (Т<sub>h</sub>17) вовлечен в прогрессирование RA. Клетки Th17 опосредуют провоспалительный ответ путем секреции IL-17A (интерлейкин-17A) и TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа), которые играют важную роль в разрушении тканей и повреждении суставного хряща, в то время как Т-рег опосредуют противовоспалительный ответ и поддерживают состояние аутоиммунной толерантности. Этот дисбаланс, по видимому, является основной причиной нескольких аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз, атеросклероз, SLE (системная красная волчанка) и другие (Li, C. et al. (Arsenic trioxide improves Treg and T<sub>h</sub>17 balance by modulating STAT3 in treatment-naïve rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunopharmacol.* 73, 539–551, 2019). Кроме того, современное лечение RA с использованием синтетических болезнь-модифицирующих противоревматических препаратов (DMARD) и биологических DMARD по отдельности или в комбинации предлагает терапевтические стратегии, но демонстрирует значительные побочные эффекты, включая гиперчувствительность, особенно связанную с иммунитетом. В этой области предпринимаются значительные исследовательские усилия для поиска терапевтической мишени, которая является эффективной и не иммуномодулирующей (Kohler et al. *Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis*, *J. Clin. Med.* 8, 1-15 (2019).

[Пар. 0002] Rizaldy et al. показали, что экстракты *Curcuma longa* и *Boswellia serrate* обладают терапевтическими преимуществами при остеоартрите (Rizaldy et al. *A randomized Controlled Trial of Curcuma Longa and Boswellia Serrata Extract in Osteoarthritis*. *Global Journal of Medical Research: Н Orthopedic and Musculoskeletal System* 19(3)), но эта статья не проливает свет на путь и агенты, ответственных за эту деятельность. Кроме того, нацеливание на изолированный сустав при остеоартрите и несколько суставов при RA совершенно разные.

[Пар. 0003] Svensson et al. убедили, что комбинированная терапия эффективно работает против артрита с лучшей эффективностью и меньшими побочными эффектами посредством неиммуномодулирующего подхода к FLS, включающего ингибитор TNF и Fc-Ig1 и Ig2 (Svensson et al. *Synoviocyte-targeted therapy synergizes with TNF inhibition in arthritis reversal*. *Sci. Adv.* 6, eaba4353, Pgs. 1-17 (2020)).

[Пар. 0004] Shaikh et al. показали, что куркумин обладает более сильным противовоспалительным действием по сравнению с другими куркуминоидами при лечении ревматоидного артрита. Кроме того, они показали, что DMC и BDMC препятствуют эффектам куркумина в куркуме (Shaikh et al. Does Curcumin Analogues, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin (BDMC), Enhance the Therapeutic efficacy of Curcumin in the Treatment of Rheumatoid Arthritis (RA), Nat. Prod. Chem. 8(6), Pgs. 1-9, 2020).

[Пар. 0005] Makuch et al. предоставили всесторонний обзор куркумина для лечения RA, но обнаружили, что механизм действия и его влияние на клеточные популяции нуждаются в дальнейшем изучении (The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effect of Curcumin on Immune Cell Populations, Cytokines, and In Vivo Models of Rheumatoid Arthritis, Pharmaceuticals, 14, Pgs. 1-18, 2021). Kloesch et al. показали, что лечение FLS высокими концентрациями куркумина приводило к резкому снижению жизнеспособности клеток и индуцированному апоптозу. Но молекулярный механизм куркумина был неясен. (Kloesch et al. Anti-Inflammatory and Apoptotic Effects of the Polyphenol Curcumin on Human Fibroblast-like Synoviocytes, 15, Pgs. 400-405 (2013)).

[Пар. 0006] WO 2021/090154 A1 включает комбинированное лечение остеоартрита, включающее ашваганду, обогащенную ананолидом, куркумин, обогащенный BDMC, и босвеллию, обогащенную АКВА (3-ацетил-11-кето- $\beta$ -босвеллиевая кислота). Но он не охватывает путь FLS для неиммуномодулирующих эффектов.

[Пар. 0007] Аналогичным образом, AU 2010/345338 B2 охватывает синергетическую композицию, содержащую экстракт *Boswellia* и виды куркумы для применения при воспалительных состояниях, включая артрит, но не охватывает какой-либо конкретный путь.

[Пар. 0008] По существу, существует неудовлетворенная потребность в лечении, которое является безопасным, менее токсичным и эффективным для RA, которое может действовать наряду с современными подходами и улучшать контроль заболевания без подавления иммунной системы. Кроме того, если лечение основано на натуральных травах, многие побочные эффекты, связанные с иммуномодулирующими эффектами лечения RA, могут быть преодолены.

## ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[Пар. 0009] Основной целью изобретения является раскрытие способа и композиции для применения в ингибировании пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта, включающих индивидуальную

концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот (B) или полисахаридов (PS). Другой целью является раскрытие способа и композиции для применения в ингибировании пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов у субъекта, включая композицию, обогащенную куркуминоидами BDMC и BPS (босвеллиевые кислоты и полисахариды).

[Пар. 0010] Еще одной целью настоящего изобретения является раскрытие способа и композиции для применения в регулировании дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего, включающие введение композиции, содержащей индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Другой целью является раскрытие способа и композиции для применения в смягчении дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) у млекопитающего с использованием композиции, содержащей комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0011] Другой основной целью изобретения является раскрытие способа и композиции для применения в терапевтическом лечении ревматоидного артрита у млекопитающего, причем указанный способ включает введение композиции, содержащей индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Другой целью является раскрытие способа и композиции для применения в терапевтическом лечении ревматоидного артрита у млекопитающего, причем указанный способ включает введение композиции, содержащей комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[Пар. 0013] Изобретение в целом решает вышеупомянутые проблемы, упомянутые в предшествующем контексте, охватывая способ и композицию либо BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов в отдельности, либо комбинацию композиции, обогащенной куркуминоидами BDMC и полисахаридов босвеллиевых кислот для применения в ингибировании пролиферации, миграции FLS у субъекта и регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего.

[Пар. 0014] Первый аспект изобретения относится к композиции для применения в ингибировании пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта, где указанная композиция содержит индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Также

охватывает композицию, содержащую комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0015] В еще одном аспекте изобретение относится к композиции для применения в регулировании дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17) и Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего, где композиция содержит индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Также охватывает введение комбинации обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0016] В другом аспекте изобретение относится к композиции для применения в терапевтическом лечении ревматоидного артрита у млекопитающего, где композиция содержит индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Также охватывает введение комбинации обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0017] В другом аспекте настоящего изобретения раскрыт способ ингибирования пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у млекопитающего, причем указанный способ включает стадию приведения в контакт FLS млекопитающего с композицией, содержащей индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Также охватывает композицию, содержащую комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0017] В еще одном аспекте изобретение относится к способу регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего, причем указанный способ включает стадию а) идентификации млекопитающего с дисбалансом Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-рег и б) введения композиции, содержащей индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот, полисахаридов. Также охватывает композицию, содержащую комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0018] В еще одном аспекте изобретение относится к способу терапевтического лечения ревматоидного артрита у субъекта, причем указанный способ включает стадию а) идентификации субъекта с ревматоидным артритом и б) введения композиции, содержащей индивидуальную концентрацию BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот или полисахаридов. Также охватывает композицию, содержащую комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMC и BPS.

[Пар. 0019] Более широкий объем применения настоящего изобретения будет очевиден из подробного описания ниже. Однако следует понимать, что приведенное ниже подробное описание и конкретные примеры, указывающие на предпочтительные

варианты осуществления изобретения, не должны толковаться как ограничения изобретения, и специалисты в данной области техники могут вносить различные изменения и модификации, такие как изменение диапазона концентраций используемых образцов, производных/аналогов куркуминоидов, BPS, экспериментальных условий, выбора млекопитающих, которые находятся в пределах сущности и объема изобретения из этого подробного описания.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Материалы заявки содержат по меньшей мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии данного патента или заявки на патент с цветными графическими материалами будут предоставлены Ведомству по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[Пар. 0020] На фиг. 1 и 2 показано иммуноокрашивание виментина в FLS.

[Пар. 0021] На фиг. 3 показано зависящее от концентрации ингибирование пролиферации FLS с использованием AC3 при 10, 20 и 40 мкг/мл.  $P < 0,01$  по сравнению с контролем FLS при 20 и 40 мкг/мл.

[Пар. 0022] На фиг. 4 показан процент ингибирования AC3 дозозависимым образом при 10, 20 и 40 мкг/мл.  $P < 0,01$  по сравнению с контролем FLS при 20 и 40 мкг/мл.

[Пар. 0023] На фиг. 5 показан сравнительный эффект ингибирования пролиферации FLS любым из куркуминоидов, AC3, C3 и BPS.  $P < 0,01$  по сравнению с контролем FLS, за исключением BPS.

[Пар. 0024] На фиг. 6 показано влияние AC3 и BPS на ингибирование пролиферации FLS.  $P < 0,01$  по сравнению с контролем FLS для комбинации для AC3 и комбинации

[Пар. 0025] На фиг. 7 показано ингибирование клеточного цикла куркуминоидов, AC3, C3 и BPS.

[Пар. 0026] На фиг. 8 показан процент клеток в S-фазе при обработке любым из куркуминоидов, AC3, C3 и BPS.

[Пар. 0027] На фиг. 9 показан процент клеток при индивидуальной обработке AC3, BPS, а также в комбинации.

[Пар. 0028] На фиг. 10-18 показано ингибирование клеточного цикла с использованием FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией) для: без обработки (фиг. 10), куркумина (фиг. 11), BDMC (фиг. 12), DMC (фиг. 13), AC3 (фиг. 14), C3 (фиг. 15), BPS (фиг. 16) при 40 и 80 мкг/мл (фиг. 17), соответственно, комбинации AC3 и BPS при 10 и 40 мкг/мл, соответственно (фиг. 18).

[Пар. 0029] На фиг. 19 показано соотношение Вах/Vcl2 (Vcl2 - белок В-клеточной лимфомы 2, Вах - Vcl2-подобный белок 4), свидетельствующее о проапоптозе с использованием любого из куркуминоидов, АС3, С3, ВPS и комбинации АС3+ВPS.  $P < 0,01$  по сравнению с контролем FLS для АС3, Сиг (куркумин) и ВDМС.  $P < 0,05$  для DMC и АС3+ВPS.

[Пар. 0030] На фиг. 20-31 показана миграция и инвазия FLS в анализе миграции при обработке контролем (фиг. 20), каждый из ВDМС (фиг. 21), куркумина (фиг. 22), DMC (фиг. 23), АС3 (фиг. 24), С3 (фиг. 25) при 15 мкг/мл, ВPS (фиг. 26), АС3 (10 мкг/мл, фиг. 27), ВPS (40 мкг/мл, фиг. 28) и комбинация АС3+ВPS (10+40 мкг/мл, фиг. 29), на фиг. 30 и 31 показано процентное ингибирование миграции.

[Пар. 0031] На фиг. 32 представлена оценка артрита при лечении контролем, контролем RA, контролем целекоксиба, куркуминоидами, АС3, С3, ВPS и комбинацией АС3+ ВPS.  $p < 0,05$  и  $**P < 0,01$ .

[Пар. 0032] На фиг. 33-35 показаны регулирующие эффекты на  $T_H17$  (фиг. 33), Т-рег (фиг. 34) и соотношение  $T_H17$ /Т-рег (фиг. 35) при лечении контролем, RA, целекоксибом, АС3, ВPS и комбинацией АС3+ВPS. Исследование FACS нормального (фиг. 36), АС3 (50 мг/кг, фиг. 37), АС3 (100 мг/кг, фиг. 38), ВPS (40 мг/кг, фиг. 39), АС3+ВPS (50 +40 мг/кг, фиг. 40), АС3+ВPS (100+40 мг/кг, фиг. 41), целекоксиб (фиг. 42)

## ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Некоторые определения

[Пар. 0033] Все термины, используемые в настоящей заявке, имеют обычное значение, известное в предшествующем уровне техники, если не указано иное. Ниже объясняются несколько других конкретных определений, используемых в настоящем изобретении, которые применяются во всем этом описании. Формула изобретения содержит более широкое определение, если не указано иное.

[Пар. 0034] В настоящей заявке любая ссылка на образец относится либо к одному, либо к комбинации следующих агентов, что приводит к терапевтическому эффекту. Указанные агенты включают куркуминоиды в целом относятся к куркумину, бисдеметоксикуркумину и деметоксикуркумину или их комбинации, где бы они ни были надлежащим образом упомянуты. Композиция, обогащенная ВDМС относится к композиции куркуминоидов, содержащей по меньшей мере 20 мас.% ВDМС. Более конкретно, АС3 относится к композиции, содержащей 20-50 мас.% бисдеметоксикуркумина, 10-25 мас.% деметоксикуркумина и 30-50 мас.% куркумина.



Комплекс С3 обогащен куркумином, содержащий 75-81% куркумина, 15-19% деметоксикуркумина и 2,2-6,5% бисдеметоксикуркумина. Босвеллиевая кислота, природный экстракт, выделенный из *Boswellia serrata*, как описано в US60/268,713, и PS представляет собой полисахарид из смолы *Boswellia serrata*. В частности, везде, где упоминаются босвеллиевые кислоты (B), общее содержание босвеллиевых кислот составляет 35-50 мас.%, стандартизованное для содержания 20-30 мас.%  $\beta$ -босвеллиевых кислот, 12 мас.% 3-ацетил-11-кето- $\beta$ -босвеллиевой кислоты (АКВА). Везде, где упоминаются полисахариды (PS), они включают 35-45 мас.% полисахаридов (PS), содержащих нейтральные сахара, состоящие из галактозы, арабинозы и D-глюкуроновой кислоты. (Композиция *Boswellia serrata* коммерчески доступна от Sami-Sabinsa Group Limited, Бангалор, Индия как Boswellin<sup>®</sup> PS)

[Пар. 0035] Терапевтический контроль или контроль относится к состоянию эффективного улучшения состояний, описанных в настоящем изобретении. Любая ссылка на контроль в этом описании относится к контролю RA без обработки или контролю целекоксиба в зависимости от эксперимента, рассмотренные примеры и детали контроля упоминаются там, где это уместно.

[Пар. 0036] Настоящее изобретение в целом охватывает способ и композицию для применения в ингибировании пролиферации, миграции фибробластоподобных синовиоцитов и регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17) и Т-клеток (T-reg), содержащих индивидуальную концентрацию BDMS, DMS, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот (B) или полисахаридов (PS). Также охватывает композицию, содержащую комбинацию обогащенных куркуминоидов BDMS и BPS. Изобретение также относится к способу терапевтического лечения ревматоидного артрита у субъекта с использованием вышеупомянутой композиции.

[Пар. 0037] В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение раскрывает композицию для применения в ингибировании пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта, где указанная композиция содержит обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMS), присутствующий в количестве не менее 20 мас.%.

[Пар. 0038] В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение раскрывает композицию для применения в регулировании дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего, где композиция содержит не менее 20 мас.% бисдеметоксикуркумина (BDMS). В родственном аспекте этого варианта осуществления дисбаланс регулировали путем восстановления клеток T<sub>h</sub>17 и увеличения Т-клеток (T-reg) (фиг. 33-35, Пример 9) при соотношении T<sub>h</sub>17/T-reg предпочтительно

равном 1 или более предпочтительно между 0 и 1 по сравнению с контролем RA при 3,5 (фиг. 35) и почти таким же хорошим, как контроль целекоксиба при 0,5 (фиг. 35).

[Пар. 0039] В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения изобретение раскрывает композицию для применения в терапевтическом лечении ревматоидного артрита у млекопитающего, где композиция содержит обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас.%. В родственном аспекте этого варианта осуществления, где лечение ревматоидного артрита у млекопитающего осуществляли путем ингибирования пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов, регулирования дисбаланса в Т-хелперах17 (T<sub>h</sub>17) и Т-клеток (Т-рег) в селезенке млекопитающего, снижения уровней маркеров воспаления и стимулирования апоптоза. В родственном аспекте этого варианта осуществления результат приводит к улучшению состояния артрита. Объем и детали ингибирования и миграции фибробластоподобных синовиоцитов, регулирующих дисбаланс Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (Т-рег), снижающих уровни маркеров воспаления, способствующих апоптозу и улучшающих состояние артрита, описаны в соответствующих вариантах осуществления.

[Пар. 0040] В другом наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение раскрывает способ ингибирования пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у млекопитающего, причем указанный способ включает стадию приведения в контакт FLS млекопитающего с композицией, содержащей обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас.%.

[Пар. 0041] В другом наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение раскрывает способ регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (Т-рег) в селезенке млекопитающего, причем указанный способ включает стадию а) идентификации млекопитающего с дисбалансом Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17) и Т-рег и b) введения композиции, содержащей обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас.%. В родственном аспекте этого варианта осуществления дисбаланс регулировали путем восстановления клеток T<sub>h</sub>17 и увеличения Т-клеток (Т-рег) (фиг. 33-35, Пример 9) при соотношении T<sub>h</sub>17/Т-рег предпочтительно равном 1 или более предпочтительно между 0 и 1 по сравнению с контролем RA при 3,5 (фиг. 35).

[Пар. 0042] В еще одном наиболее предпочтительном варианте осуществления раскрыт способ терапевтического лечения ревматоидного артрита у субъекта, причем указанный способ включает стадию а) идентификации субъекта с ревматоидным артритом

и b) введения композиции, содержащей обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас.%. В родственном аспекте этого варианта осуществления лечение ревматоидного артрита у млекопитающего осуществляли путем ингибирования пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов, регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17) и Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего, снижения уровней маркеров воспаления и стимулирования апоптоза. В родственном аспекте этого варианта осуществления результат приводит к улучшению состояния артрита. Объем и детали ингибирования и миграции фибробластоподобных синовиоцитов, регулирующих дисбаланс Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg), снижающих уровни маркеров воспаления, способствующих апоптозу и улучшающих состояние артрита, описаны в соответствующих вариантах осуществления.

[Пар. 0043] В вариантах осуществления, относящихся к пролиферации и ингибированию FLS, где композиция содержит 20-50 мас.% BDMC, 10-25 мас.% деметоксикуркумина (DMC) и 30-50 мас.% куркумина, при этом общее количество куркуминоидов в композиции находится в диапазоне 20-95 мас.%. В соответствующем аспекте этого варианта осуществления композиция дополнительно содержит босвеллиевые кислоты (B) и полисахарид (PS) из *Boswellia serrata*, где босвеллиевые кислоты и полисахариды (BPS) присутствуют в количестве в диапазоне 35-50 мас.% и 35-45 мас.% соответственно. В другом родственном аспекте этого и других вариантов осуществления, при индивидуальном применении, концентрация BDMC, DMC, куркумина, куркуминоидов, босвеллиевых кислот, полисахаридов в композиции выбрана из диапазона, составляющего от 10 до 100 мкг/мл. В этом аспекте и других связанных вариантах осуществления композиция содержит композицию, обогащенную куркуминоидами BDMC, и BPS присутствуют в комбинации в соотношении 1:1, или предпочтительно 1:2, или предпочтительно 1:3, или предпочтительно 1:4, или предпочтительно 4:1, или предпочтительно 3:1, или предпочтительно 2:1, соответственно. В родственном аспекте этого варианта осуществления изобретения C3 и BPS использовали в комбинации в качестве указанных выше диапазонов. Поиск комбинаций в пределах указанного диапазона или поиск подходящего диапазона является общеизвестным и для специалистов в области техники. Кроме того, в этом аспекте и других вариантах осуществления более предпочтительно AC3 использовать отдельно или в комбинации с BPS. В дополнительном аспекте этого и других вариантов осуществления при индивидуальном применении концентрация BDMC, куркумина, DMC, BPS, AC3, C3 используется в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл или предпочтительно в диапазоне от 20 до 80 мкг/мл или предпочтительно от 40 до 60 мкг/мл.

[Пар. 0044] В родственном аспекте этого и других вышеупомянутых вариантов осуществления ингибирование фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) происходит за счет ингибирования клеточного цикла, снижения уровней маркеров воспаления, содействия апоптозу и улучшения состояния артрита. В родственном аспекте этого варианта осуществления после обработки образцом ингибирование пролиферации FLS находится в диапазоне 10-90% или более предпочтительно в диапазоне 50-90% или наиболее предпочтительно в диапазоне 60-90% по сравнению с контролем без обработки (фиг. 3-6, пример 2). В родственном аспекте этого варианта осуществления после обработки образцом ингибирование клеточного цикла происходит в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, а процент клеток в фазе S находится в диапазоне от 1 до 20% или более предпочтительно в диапазоне от 1 до 10% или наиболее предпочтительно в диапазоне от 1 до 5% (фиг. 7-9, пример 3). В родственном аспекте этого варианта осуществления изобретения маркеры воспаления выбраны из группы, состоящей из TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL-5, MMP-3 и катепсина. В дополнительном аспекте этого варианта осуществления после обработки соответствующим образцом(образцами) уровни экспрессии маркеров воспаления снижаются по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60% по сравнению с контролем без обработки (Таблица 3, Пример 4). В дополнительном аспекте этого варианта осуществления исследование ELISA (иммуноферментный анализ) для воспалительного маркера IL6 показало, что комбинация AC3 и BPS продемонстрировала лучшее ингибирование по сравнению с AC3 или BPS, используемыми по отдельности (пример 4). В дополнительном аспекте этого варианта осуществления после обработки образцом апоптоз стимулировали с увеличением соотношения Вах/Bcl2 в диапазоне 1-1,5 или предпочтительно в соотношении 1,25-1,5 по сравнению с контролем без обработки при 1 (фиг. 19, пример 5). В дополнительном аспекте этого варианта осуществления миграция FLS ингибировалась после обработки образцом (фиг. 20-31, пример 6), при этом ингибирование миграции находится в диапазоне 40-80%, или предпочтительно 50-80%, или более предпочтительно 50-70% (фиг. 30) по сравнению с необработанным контролем, и комбинация AC3+BPS была эффективной по сравнению с индивидуальным лечением (фиг. 31). В другом аспекте этого варианта осуществления после обработки образцом состояние артрита находится в диапазоне 1-3, более предпочтительно в диапазоне 1-2 по сравнению с контролем без (фиг. 32, пример 8, контроль RA составляет 3,5, положительный контроль целекоксиба составляет 1).

[Пар. 0045] В вариантах осуществления, относящихся к регулированию дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg) в селезенке млекопитающего и терапевтическому лечению RA у млекопитающего, композиция при индивидуальном применении предпочтительно выбрана из диапазона, состоящего из от 40 мг/кг до 100 мг/кг или предпочтительно 50-100 мг/кг массы тела млекопитающего. В родственном варианте осуществления, где композиция, обогащенная куркуминоидами BDMC, и BPS присутствуют в комбинации в соотношении 1:1, или предпочтительно 1:2, или предпочтительно 1:3, или предпочтительно 1:4, или предпочтительно 4:1, или предпочтительно 3:1, или предпочтительно 2:1, соответственно.

[Пар. 0046] В другом родственном варианте осуществления композиция дополнительно содержит стабилизирующие агенты, усилители биодоступности и антиоксиданты, фармацевтически, или нутрицевтически, или космецевтически приемлемые эксципиенты и усилители, и подходящим образом составлена для перорального введения в форме таблеток, капсул, сиропов, жевательного мармелада, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных изделий, конфет или пищевых продуктов (Пример 10). Специалисту в данной области техники вполне по силам придумать подходящий состав для введения.

## ПРИМЕРЫ

[Пар. 0047] Пример 1: Выделение и культивирование фибробластоподобных синовиоцитов (FLS): Синовиальные ткани получали от коллаген-индуцированных крыс с артритом в стерильных условиях в соответствии со способом, которому следовали (JinjunZhao, Qingqing Ouyang, Ziyou Hu, Qin Huang, Jing Wu, Ran Wang и Min Yang. A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts. Biomedical Reports 5: 171-175, 2016).

[Пар. 0049] FLS выделяли из синовиальных тканей ферментативным расщеплением. Вкратце, ткани разделяли на блоки объемом 1 мм<sup>3</sup> с помощью микрохирургических ножниц. После чего ткани инкубировали с 0,1% ферментом коллагеназы типа II в DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко) с добавлением 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) для ферментативного расщепления при 37 °C в течение 45 минут в инкубаторе орбитального шейкера (200 об/мин).

[Пар. 0050] После времени инкубации пробирки интенсивно перемешивали на вихревой мешалке в течение 1-2 минут для высвобождения клеток и фильтровали с использованием сетчатого фильтра 100 мкм. Фильтрат центрифугировали в течение 5 мин

при 1200 об/мин, клетки ресуспендировали в DMEM с добавлением 10% FBS и 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина и культивировали в увлажненном инкубаторе при 37 °С при 5% CO<sub>2</sub>. После идентификации FLS на основе морфологии клеток и иммуноцитохимического окрашивания антителом к виментину (PA5-27231, Thermo Fisher Scientific) (фиг. 1 и 2) для дальнейших исследований использовали клетки 4-7 пассажей.

[Пар. 0048] Пример 2: Анализ пролиферации WST-1: анализ WST-1 использовали для измерения влияния различных образцов на пролиферацию FLS. FLS высевали в 96-луночные планшеты с плотностью  $5 \times 10^3$  клеток/лунку и инкубировали в течение ночи при 37 °С при 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями образца (AC3, C3, Cur, BDMC, DMC, BPS), как показано на фиг. 3-6, в течение 72 часов. После периода обработки в каждую лунку добавляли 100 мкл реагента WST-1 (5015944001, Sigma, США), разбавленного 1:10 в бессывороточной культуральной среде DMEM, и инкубировали при 37 °С при 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов. Поглощение измеряли при 450 нм с эталонной длиной волны 610 нм. AC3 продемонстрировал лучшее ингибирование пролиферации FLS при 20 мкг/мл и 40 мкг/мл (фиг. 3 и 4) дозозависимым образом. Сравнительное исследование аналогов куркуминоидов в ингибировании пролиферации FLS показало тенденцию BDMC > куркумин > DMC (фиг. 5) при 20 мкг/мл, тогда как BPS показал только 10 % ингибирование, и комбинация была намного эффективнее, чем индивидуально используемые Boswellin PS (BPS) или AC3 (фиг. 6).

[Пар. 0049] Пример 3: Анализ клеточного цикла: клетки FLS ( $8 \times 10^4$  клеток/лунку) высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °С при 5% CO<sub>2</sub>. После синхронизации в бессывороточной среде в течение 24 часов клетки обрабатывали с или без присутствия образцов в DMEM 10% FBS в течение 24 часов. После периода обработки клетки собирали, суспендировали в ледяном PBS (фосфатно-солевой буферный раствор). После центрифугирования клетки фиксировали путем добавления 70% ледяного этанола по каплям к осадку при перемешивании на вортексе и хранили при 4 °С в течение 30 минут. Клетки окрашивали раствором йодида пропидия (PI) (50 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С в темноте. Содержание ДНК анализировали с помощью проточной цитометрии (проточный цитометр BD FACS Celesta). AC3, BDMC среди куркуминоидов показали максимальное ингибирование репликации FLS (фиг. 7, 8, 12 и 14), и FLS был остановлен в фазе G0/G1. Boswellin PS (BPS) показал ингибирование только при 80 мкг/мл (фиг. 8, фиг. 16). Эффект комбинации (AC3+BPS) на ингибирование клеточного цикла был лучше, чем у отдельных используемых образцов (AC3 и BPS), как показано на фиг. 9.

[Пар. 0050] Пример 4: Измерение воспалительных маркеров: клетки FLS ( $8 \times 10^4$  клеток/лунку) высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °C при 5% CO<sub>2</sub>. Клетки индуцировали 10 нг/мл рекомбинантного крысиного TNF- $\alpha$  (кат. № 400-14, Rerotech, штат Нью-Джерси, США) с или без присутствия различных концентраций образца в DMEM 10% FBS в течение 6 часов и 24 часов для оценки противовоспалительного эффекта образца. Куркумин продемонстрировал лучшую противовоспалительную активность, подавляя маркеры воспаления (IFN- $\gamma$ , CCL-5, MMP-3 и катепсин, таблица 2), тогда как BDMC был наиболее эффективным при TNF- $\alpha$ , и, что наиболее важно, комбинация AC3 и BPS была наиболее эффективной из всех (таблица 2).

[Пар. 0051] ELISA: После инкубационного периода в 24 часа собирали культуральные супернатанты и оценивали маркер воспаления IL6 методом ELISA. Для концентраций 10 мкг/мл (AC3) и 40 мкг/мл (BPS) при использовании в комбинации ингибирование составляло 20% по сравнению с 3 и 1% при использовании AC3 и BPS по отдельности.

Используемый набор - Rat IL-6 DuoSet ELISA R&D Systems, DY506-05.

[Пар. 0052] Исследование экспрессии RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией): через 6 часов инкубации общую клеточную РНК из необработанных и обработанных клеток выделяли с использованием реагента Trizol<sup>®</sup> (Ambion, Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя с последующей обработкой ДНКазой I без РНКазы (ThermoFisher Scientific) для удаления любой геномной ДНК. Качество и концентрацию матричной РНК анализировали спектрофотометрически (NanoDrop Lite, ThermoFisher Scientific). Один микрограмм тотальной РНК обратно транскрибировали в кДНК с использованием набора для синтеза кДНК Revert-aid First Strand (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя и хранили при -80 °C до использования.

[Пар. 0053] Затем 20 мкл реакционной смеси подвергали PCR с использованием мастер-микса SYBR green qPCR (количественная PCR) для амплификации кДНК с использованием специально разработанных праймеров, полученных от Eurofins India, в качестве внутреннего контроля, ген "домашнего хозяйства"  $\beta$ -актин, совместно амплифицировали с каждой реакцией (таблица 2). PCR проводили в Light cycler 96 (Roche Life Science), и условия PCR для генов включали начальную денатурацию при 95 °C в течение 10 мин, затем 35 циклов, состоящих из денатурации при 95 °C в течение 30 секунд, отжига праймеров при 60 °C в течение 30 секунд, удлинения при 72 °C в течение 30 секунд и окончательного охлаждения при 72 °C в течение 30 секунд (таблица 1).

[Пар. 0054] Таблица 1: Последовательности для RT-PCR

R β-актин F	CCCGCGAGTACAACCTTCT-Seq ID 1
R β-актин R	CGTCATCCATGGCGAACT-Seq ID 2
R-Ccl5 -F	CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC-Seq ID 3
R-Ccl5 -R	ACACACTTGGCGGTTCTTCGA-Seq ID 4
R-TNFα -F	ACTGAACTTCGGGGTGATTG-Seq ID 5
R-TNFα -R	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-Seq ID 6
R-IFNγ-F	AGTCTGAAGAACTATTTTAACTCAAGTAGCAT-Seq ID 7
R-IFNγ-R	CTGGCTCTCAAGTATTTTCGTGTTAC-Seq ID 8
R-MMP3-F	ATGATGAACGATGGACAGATGA-Seq ID 9
R-MMP3-R	CATTGGCTGAGTGAAAGAGACC-Seq ID 10
R-MMP13-F	ACCCAGCCCTATCCCTTGAT-Seq ID 11
R-MMP13-R	TCTCGGGATGGATGCTCGTA-Seq ID 12
R-CATH-F	AATTGTGACCGTGATAATGTG-Seq ID 13
R-CATH-R	GCAGGCGTTGTTCTTATTC-Seq ID 14

[Пар. 0055] Таблица 2: Воспалительные маркеры

Образец	TNF-α	IFN-γ	CCL-5	MMP-3	Катепсин
Контроль	1	1	1	1	1
Индуцированный	7,93±2,4	5,7±0,05	7,16±1,9	5,14±1,17	3,86±0,35
С3 (10 мкг/мл)	5,08±0,69	4,11±0,08	5,66±0,31	4,22±0,33	3,0±0,01
АС3 (10 мкг/мл)	5,06±0,59	4,40±0,10	4,90±1,16	4,38±0,19	3,25±0,12
DMC (10 мкг/мл)	3,57±1,77	4,43±0,15	7,03±3,03	4,91±0,41	3,69±0,14
BDMC (10 мкг/мл)	3,20±2,1	4,57±0,11	4,07±0,05	6,07±0,05	3,36±0,37
Куркумин (10 мкг/мл)	3,93±0,84	2,7±0,19	3,01±0,04	3,98±0,48	2,70±0,14
BPS (40 мкг/мл)	5,76±0,78	3,16±0,05	8,52±2,82	4,33±0,76	3,21±0,15
АС3+BPS	2,41±0,13	2,63±0,53	3,07±0,24	3,90±0,24	2,62±0,15



(10+40 мкг/мл)					
----------------	--	--	--	--	--

[Пар. 0056] Пример 5: Анализ апоптоза. Апоптоз FLS оценивали с помощью исследования экспрессии RT-PCR. Короче говоря, клетки FLS ( $8 \times 10^4$  клеток/лунку) высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °C при 5% CO<sub>2</sub>. После синхронизации в бессывороточной среде в течение 24 часов клетки обрабатывали с или без присутствия образцов в DMEM 10% FBS в течение 24 часов. После периода обработки клетки собирали, выделяли общую клеточную РНК и обрабатывали для анализа RT-PCR (таблица 3), как упоминалось ранее. Семейство белков Bcl-2 и Bax играет центральную роль в регуляции апоптоза. Соотношение BAX/BCL-2 может действовать как реостат, который определяет восприимчивость клеток к апоптозу, клетки, подвергающиеся апоптозу, имеют более высокое соотношение BAX/BCL-2 (фиг. 19). Среди куркуминоидов BDMC>DMC>куркумин и комплекс AC3 были лучше, чем комплекс C3 (фиг. 19) по сравнению с контролем.

[Пар. 0057] Таблица 3: Последовательности для анализа RT-PCR

R Bax F	ATGGACGGGTCCGGGGAG-Seq ID 15	18
R Bax R	ATCCAGCCCAACAGCCGC-Seq ID 16	18
R Bcl-2 F	AAGCCGGCGACGACTTCT-Seq ID 17	18
R Bcl-2 R	GGTGCCGGTTCAGGTACTCA-Seq ID 18	20

[Пар. 0058] Пример 6: Миграция - анализ. Миграция и инвазия FLS играет важную роль в синовите и разрушении кости. FLS мигрирует локально, а также может проникать в отдаленные области и суставы через кровотоки. RA-FLS секретируют MMP, которые еще больше усугубляют деградацию матрикса хряща, что в конечном итоге приводит к эрозии кости.

[Пар. 0059] Потенциал миграции FLS может быть изучен с помощью простого анализа застывания царапины и оценки закрытия раны с помощью миграции FLS. FLS без обработки мигрируют и закрывают рану, в то время как с обработкой закрывают с задержкой (J Immunol March 1, 2014, 192 (5) 2063-2070). Клетки FLS ( $5 \times 10^4$  клеток/лунку)

высевали в 24-луночные планшеты, инкубировали при 37 °C при 5% CO<sub>2</sub> до достижения слияния около 80-90%, а затем ранили путем царапания наконечником пипетки объемом 200 мкл. Клетки промывали PBS для обеспечения полного удаления дебриса и плавающих клеток. Затем клетки инкубировали с различной концентрацией образца в среде DMEM, содержащей 2% FBS. Контрольный образец содержал клетки и культуральную среду без какого-либо образца. Миграцию клеток оценивали путем оценки смыкания зазора монослоя с использованием программного обеспечения Magvision. Процент ингибирования закрытия раны рассчитывали по сравнению с контрольными лунками. Среди куркуминоидов, каждый в концентрации 15 мкг/мл, BDMC (фиг. 21) был лучше, чем DMC (фиг. 23), куркумин (фиг. 22), тогда как комплекс AC3 (фиг. 24) был лучше, чем комплекс C3 (фиг. 25), и AC3+Boswellin PS (BPS) (фиг. 29) был лучше, чем AC3 (фиг. 27) и BPS (фиг. 28) по сравнению с контролем (фиг. 20).

[Пар. 0060] Пример 7: Исследование артрита на крысах

[Пар. 0061] Модель мыши (Таблица 4) коллаген-индуцированный артрит (CIA) представляет собой широко изученную модель аутоиммунного ревматоидного артрита. В этой модели аутоиммунный артрит индуцируется иммунизацией коллагеном типа II (CII), эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда. У этих животных развивается аутоиммунный полиартрит, который имеет несколько общих клинических, гистологических и иммунологических признаков с аутоиммунным заболеванием человека - ревматоидным артритом. Иммунный ответ на CII характеризуется как стимуляцией коллаген-специфических Т-клеток, так и выработкой высоких титров антител, специфичных как к иммуногену (гетерологичный CII), так и к аутоантигену (мышинный или крысиный CII).

[Пар. 0062] Таблица 4: Исследовательская группа

№ группы	Группа лечения	Доза	Номер животного
1	Контроль	-	6
2	Контроль артрита	Коллаген-индуцированный РА	10
3	Положительный контроль (целекоксиб)	10 мг/кг	6
4	АС3	50 мг/кг	6
5	АС3	100 мг/кг	6
6	С3	50 мг/кг	6

7	C3	100 мг/кг	6
8	AC3+BPS	50 мг/кг+40 мг/кг	6
9	AC3+BPS	100 мг/кг+40 мг/кг	6

[Пар. 0063] Артрит, индуцированный введением коллагена типа 2 (грудной хрящ курицы, каталожный номер Sigma: C9301), который будет эмульгирован с неполным адьювантом Фрейнда (FIA) в соотношении 1:1. В день 0 крысам внутрикожно вводили 200 мкл (200 мкг/животное) эмульсии коллаген-FIA у основания хвоста (первая иммунизация). Для бустерной инъекции эмульсию готовили так же, как указано выше, и вводили 100 мкл (100 мкг/животное) эмульсии коллаген-FIA, вводимой на 7-й день. Испытуемый образец вводили с 0 по 20 день.

[Пар. 0064] Пример 8: Состояние артрита. Стандартизированный метод оценки артрита применяли для оценки степени отечности и эритемы всех четырех лап 0 - без признаков; 1 - покраснение без отека; 2 - покраснение с легким отеком; 3 - покраснение с сильным отеком; 4 - покраснение, сильный отек и скованность в движении. Комбинация AC3 и BPS (фиг. 32) была эффективной при концентрациях 100 и 40 мг/кг соответственно. Целекоксиб использовали в качестве положительного контроля наряду с контролем ревматоидного артрита.

[Пар. 0065] Пример 9: Анализ T-рег и T<sub>h</sub>17 в селезенке. Выделение клеток селезенки. Селезенку получали от крыс с коллаген-индуцированным артритом в стерильных условиях для выделения лимфоцитов. Селезенку дважды промывали PBS, содержащим 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина, и разрезали на мелкие кусочки с помощью микрохирургических ножниц, гомогенизировали с помощью поршневого конца шприца и фильтровали с использованием сетчатого фильтра 100 мкм. Фильтрат центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин, промывали 1-2 раза PBS, после чего  $1 \times 10^6$  клеток/мл суспендировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS. Дисбаланс осуществляли путем восстановления клеток T<sub>h</sub>17 и увеличения количества T-клеток (T-рег) (фиг. 33-35) при соотношении T<sub>h</sub>17/T-рег предпочтительно равном 1, или более предпочтительно между 0-1 по сравнению с контролем RA при 3,5 (фиг. 35).

[Пар. 0066] Анализ методом проточной цитометрии (FCM). Для оценки клеток T<sub>h</sub>17 и T-рег выделенные лимфоциты стимулировали в течение 4 часов 20 нг/мл форболмирилата ацетата (P8139, Sigma) и 500 нг/мл иономицина вместе с BD GolgiStop, ингибитором транспорта белка, содержащим монензин (554724, BD) в концентрации, предложенной производителем.

[Пар. 0067] После стимуляции клетки собирали и аликвотировали  $2 \times 10^5$  клеток в разные пробирки для оценки популяции T<sub>h</sub>17 и T-рег. Разведения антител, используемые

для анализа, соответствовали рекомендациям соответствующего производителя. Для оценки популяции T<sub>h</sub>17 клетки первоначально окрашивали антителами FITC Mouse Anti-Rat CD3 (FITC-антитела мыши против CD3 крысы) (559975, BD pharmingen) и APC Mouse Anti-Rat CD4 (APC-антитела мыши против CD4 крысы) (550057, BD pharmingen). Для оценки популяции T-рег клетки первоначально окрашивали антителами APC Mouse Anti-Rat CD4 (APC-антитела мыши против CD4 крысы) (550057, BD pharmingen) и BV421 Mouse Anti-Rat CD25 (BV421-антитела против CD25 крысы) (565608, BD pharmingen). После добавления соответствующих антител к поверхностному окрашиванию пробирки инкубировали в течение 30 мин при 4 °С в темноте. После окрашивания поверхности клетки фиксировали и пермеабелизовали с использованием раствора для фиксации и пермеабелизации (BD Cytotfix/Cytoperm, 554722) в соответствии с инструкциями производителя и ресуспендировали в сапонинсодержащем буфере (BD Perm/Wash, 554723). После фиксации и пермеабелизации клетки T<sub>h</sub>17 и T-рег инкубировали с конъюгированными с PE антителами крысы против IL-17A мыши (PE Rat Anti-Mouse IL-17A) (12-7177-81, eBioscience) и конъюгированными с PE антителами против FOXP3 (12-5773-80, eBioscience), соответственно, в течение 30 минут при 4 °С в темноте. Затем клетки дважды промывали сапонинсодержащим буфером и ресуспендировали в окрашивающем буфере перед проточным цитометрическим анализом. FCM проводили на системе BD FACSCelesta (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

[Пар. 0068] Пример 10: Составы: Композиция составлена вместе с фармацевтически/нутрицевтически приемлемыми эксципиентами, адъювантами, разбавителями, стабилизирующими агентами, диспергируемыми смолами, усилителями биодоступности или носителями и вводится перорально в форме таблеток, капсул, сиропов, жевательного мармелада, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных изделий, конфет или пищевых продуктов.

[Пар. 0069] В родственном аспекте усилитель биодоступности выбран из группы, состоящей из пиперина (BioPerine®), кверцетина, экстракта чеснока, экстракта имбиря и нарингина. В другом связанном аспекте стабилизирующий агент выбран из группы, состоящей из розмариновой кислоты, бутилированного гидроксизола, бутилированного гидрокситолуола, метабисульфита натрия, пропилгаллата, цистеина, аскорбиновой кислоты и токоферолов. В еще одном связанном аспекте диспергируемые камеди выбраны из группы, состоящей из агара, альгината, каррагинана, гуммиарабика, гуаровой камеди, камеди рожкового дерева, конжаковой камеди, ксантановой камеди и пектина.

[Пар. 0070] В таблицах 5-9 приведены иллюстративные примерынутрицевтических составов, содержащих бисдеметоксикуркумин

[Пар. 0071] Таблица 5: Таблетки

Действующее вещество АС3 Boswellin PS
Экципиенты Микрокристаллическая целлюлоза, коллоидный диоксид кремния, стеарат магния, BioPerine®, поливинилпирролидон/крахмал/гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза

[Пар. 0072] Таблица 6: Капсула

Действующее вещество АС3 Boswellin PS
Экципиенты Микрокристаллическая целлюлоза, BioPerine®

[Пар. 0073] Таблица 7: Порошок

Действующее вещество АС3 Boswellin PS
Экципиенты BioPerine®

[Пар. 0074] Таблица 8: Жевательный состав

Действующее вещество АС3 Boswellin PS
Экципиенты BioPerine®, желатин (270 Bloom Mesh 10), рафинированный сахар, кукурузный сироп с глюкозой, лимонная кислота, молочная кислота, вода, натуральный ароматизатор манго M38630, винная кислота, рафинированный сахар

[Пар. 0075] Таблица 9: Состав конфет

Действующее вещество АСЗ Boswellin PS
Экципиенты BioPerine®, сахароза, жидкая глюкоза, ароматизатор, ментол, подкислители (лимонная кислота/винная кислота/малеиновая кислота), очищенная вода

[Пар. 0076] Вышеуказанные составы являются просто иллюстративными примерами; любой состав, содержащий вышеуказанный активный ингредиент, предназначенный для указанной цели, будет считаться эквивалентным.

[Пар. 0077] Другие модификации и вариации изобретения будут очевидны специалистам в данной области из приведенного выше описания и идей. Таким образом, хотя здесь были конкретно описаны только определенные варианты осуществления, очевидно, что в них могут быть внесены многочисленные модификации без отклонения от сущности и объема изобретения и его следует интерпретировать только в сочетании с прилагаемой формулой изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения в ингибировании пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) у субъекта, содержащая обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас. %.

2. Композиция для применения по п. 1, где композиция содержит 20-50 мас. % BDMC, 10-25 мас. % деметоксикуркумина (DMC) и 30-50 мас. % куркумина, при этом общее количество куркуминоидов в композиции находится в диапазоне 20-95 мас. %.

3. Композиция для применения по п. 1, при индивидуальном применении концентрация BDMC, DMC, куркумина или куркуминоидов в композиции выбрана из диапазона 10-100 мкг/мл.

4. Композиция для применения по п. 3, где композиция дополнительно содержит босвеллиевые кислоты (B) и полисахарид (PS) из *Boswellia serrata*, причем босвеллиевые кислоты содержат 35-50 мас. % босвеллиевых кислот, 20-30 мас. %  $\beta$ -босвеллиевых кислот, 12 мас. % 3-ацетил-11-кето- $\beta$ -босвеллиевой кислоты (АКВА) и полисахариды в диапазоне 35-45 мас. %.

5. Композиция для применения по п. 4, при индивидуальном применении концентрация босвеллиевых кислот, полисахаридов выбрана из диапазона 10-100 мкг/мл.

6. Композиция для применения по п. 1, где композиция, обогащенная куркуминоидами BDMC, и BPS (босвеллиевые кислоты и полисахариды) присутствуют в комбинации в соотношении 1-4:4-1.

7. Композиция для применения по п. 1, где ингибирование фибробластоподобных синовиоцитов (FLS) осуществляют путем ингибирования клеточного цикла, снижения уровней маркеров воспаления и содействия апоптозу.

8. Композиция для применения по п. 7, где ингибирование клеточного цикла происходит в фазе G0/G1.

9. Композиция для применения по п. 7, где апоптоз оценивают как отношение Bax к Bcl-2.

10. Композиция для применения по п. 7, где маркеры воспаления выбирают из группы, состоящей из TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа), IFN- $\gamma$  (интерферон гамма), CCL-5 (лиганд 5 C-C мотива), MMP-3 (матриксная металлопротеиназа 3) и катепсина.

11. Композиция для применения по п. 1, где ингибирование фибробластоподобных синовиоцитов приводит к улучшению состояния артрита.

12. Композиция для применения по п. 1, где субъект представляет собой млекопитающее.

13. Композиция для применения в регулировании дисбаланса Т-хелперов 17 ( $T_H17$ ) и Т-клеток (Т-рег) в селезенке млекопитающего, где указанная композиция содержит обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас. %.

14. Композиция для применения по п. 13, где композиция содержит 20-50 мас. % BDMC, 10-25 мас. % DMC и 30-50 мас. % куркумина, при этом общее количество куркуминоидов в композиции находится в диапазоне 20-95 мас. %.

15. Композиция для применения по п. 13, где при индивидуальном применении концентрация BDMC, DMC, куркумина или куркуминоидов в композиции выбрана из диапазона 40-100 мг/кг массы тела млекопитающего.

16. Композиция для применения по п. 13, где композиция дополнительно содержит босвеллиевые кислоты (B) и полисахарид (PS) из *Boswellia serrata*, где босвеллиевые кислоты содержат 35-50 мас. % босвеллиевых кислот, 20-30 мас. %  $\beta$ -босвеллиевых кислот, 12 мас. % 3-ацетил-11-кето- $\beta$ -босвеллиевой кислоты (АКВА) и полисахариды в диапазоне 35-45 мас. %.

17. Композиция для применения по п. 16, при индивидуальном применении концентрации босвеллиевых кислот полисахариды выбраны из диапазона 40-100 мг/кг массы тела млекопитающего.

18. Композиция для применения по п. 13, где обогащенная композиция куркуминоидов BDMC и BPS присутствуют в комбинации в соотношении 1-4:4-1.

19. Композиция для применения по п. 13, где дисбаланс регулируют путем уменьшения количества клеток  $T_H17$  и увеличения количества Т-клеток (Т-рег (регуляторные Т-клетки)), тем самым уменьшая соотношение  $T_H17$ /Т-рег.

20. Композиция для применения по п. 13, дополнительно содержащая стабилизирующие агенты, усилители биодоступности и антиоксиданты, фармацевтически, или нутрицевтически, или космецевтически приемлемые эксципиенты и усилители, и вводимая перорально в форме таблеток, капсул, сиропов, жевательного мармелада, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных изделий, конфет или пищевых продуктов.

21. Композиция для применения в терапевтическом лечении ревматоидного артрита у млекопитающего, где композиция содержит обогащенный бисдеметоксикуркумин (BDMC), присутствующий в количестве не менее 20 мас. %.

22. Композиция для применения по п. 21, где композиция содержит 20-50 мас. % бисдеметоксикуркумина, 10-25 мас. % деметоксикуркумина и 30-50 мас. % куркумина, при этом общее количество куркуминоидов в композиции находится в диапазоне 20-95 мас. %.



23. Композиция для применения по п. 21, при индивидуальном применении концентрация BDMC, DMC, куркумина или куркуминоидов в композиции выбрана из диапазона 40-100 мг/кг массы тела млекопитающего.

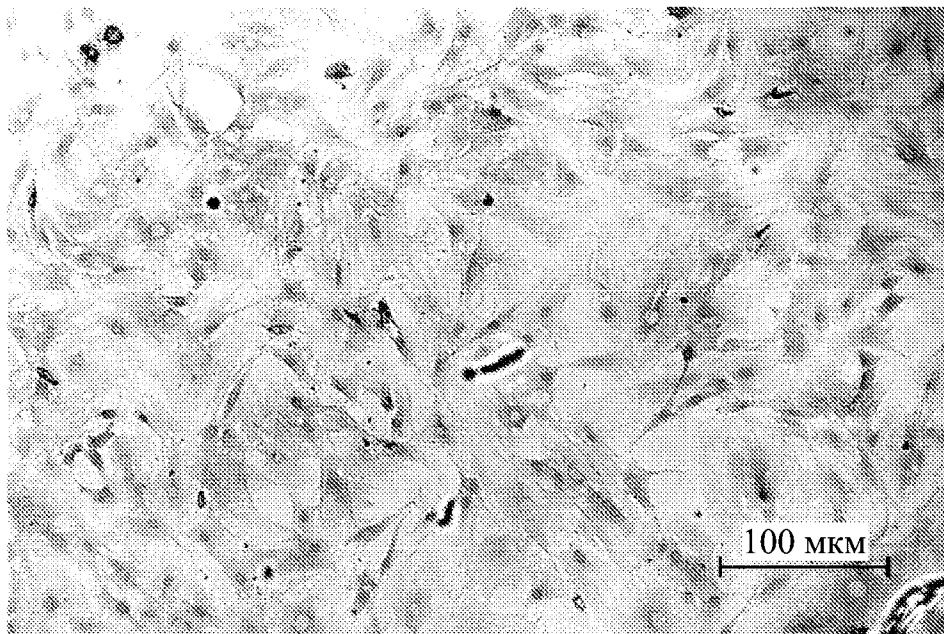
24. Композиция для применения по п. 21, где композиция дополнительно содержит босвеллиевые кислоты (B) и полисахарид (PS) из *Boswellia serrata*, где босвеллиевые кислоты и полисахариды (BPS) присутствуют в диапазоне 35-50 мас.% и 35-45 мас.% соответственно.

25. Композиция для применения по п. 24, при индивидуальном применении концентрация босвеллиевых кислот, полисахаридов выбрана из диапазона 40-100 мг/кг массы тела млекопитающего.

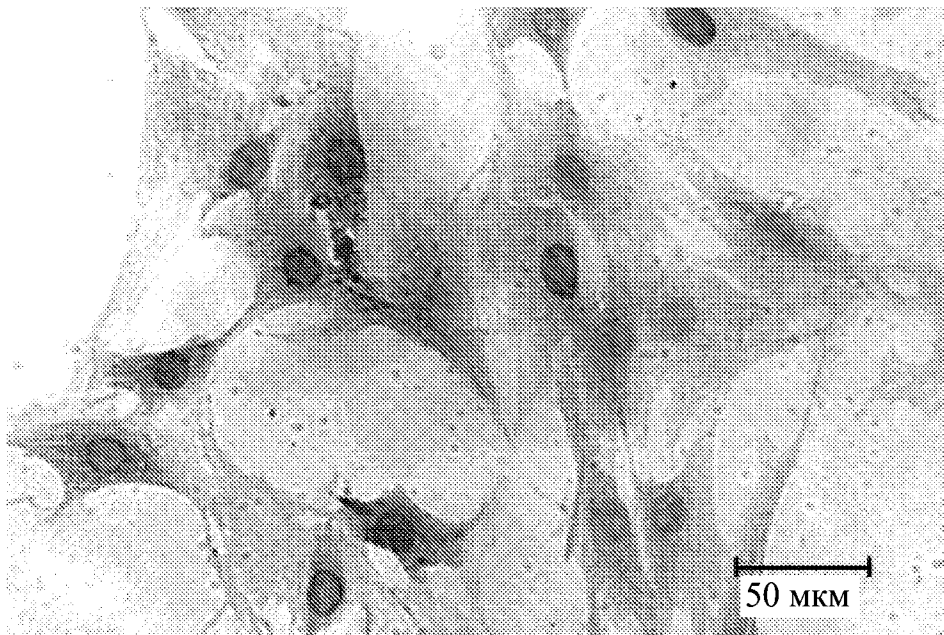
26. Композиция для применения по п. 21, где композиция, обогащенная куркуминоидами BDMC и BPS присутствуют в комбинации в соотношении 1-4:4-1.

27. Композиция для применения по п. 21, где лечение ревматоидного артрита у млекопитающего осуществляют путем ингибирования пролиферации и миграции фибробластоподобных синовиоцитов, регулирования дисбаланса Т-хелперов 17 (T<sub>h</sub>17), Т-клеток (T-reg), снижения уровней маркеров воспаления, содействия апоптозу и улучшения состояния артрита.

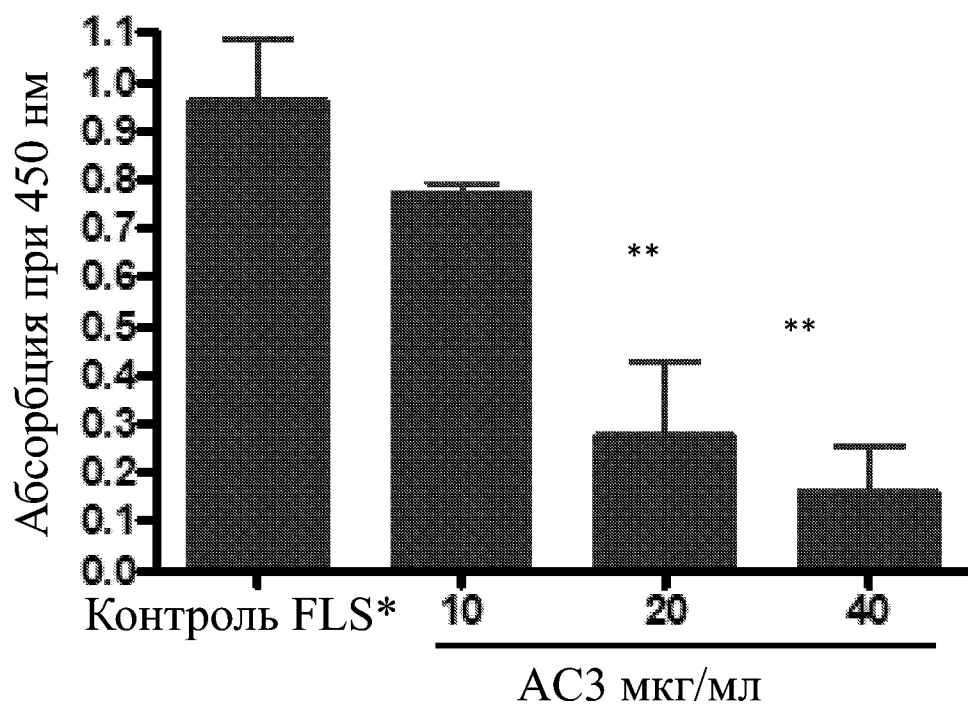
28. Композиция для применения по п. 21, дополнительно содержащая стабилизирующие агенты, усилители биодоступности и антиоксиданты, фармацевтически, или нутрицевтически, или космецевтически приемлемые эксципиенты и усилители, и которую вводят перорально в форме таблеток, капсул, сиропов, жевательного мармелада, порошков, суспензий, эмульсий, жевательных изделий, конфет или пищевых продуктов.



Фиг. 1

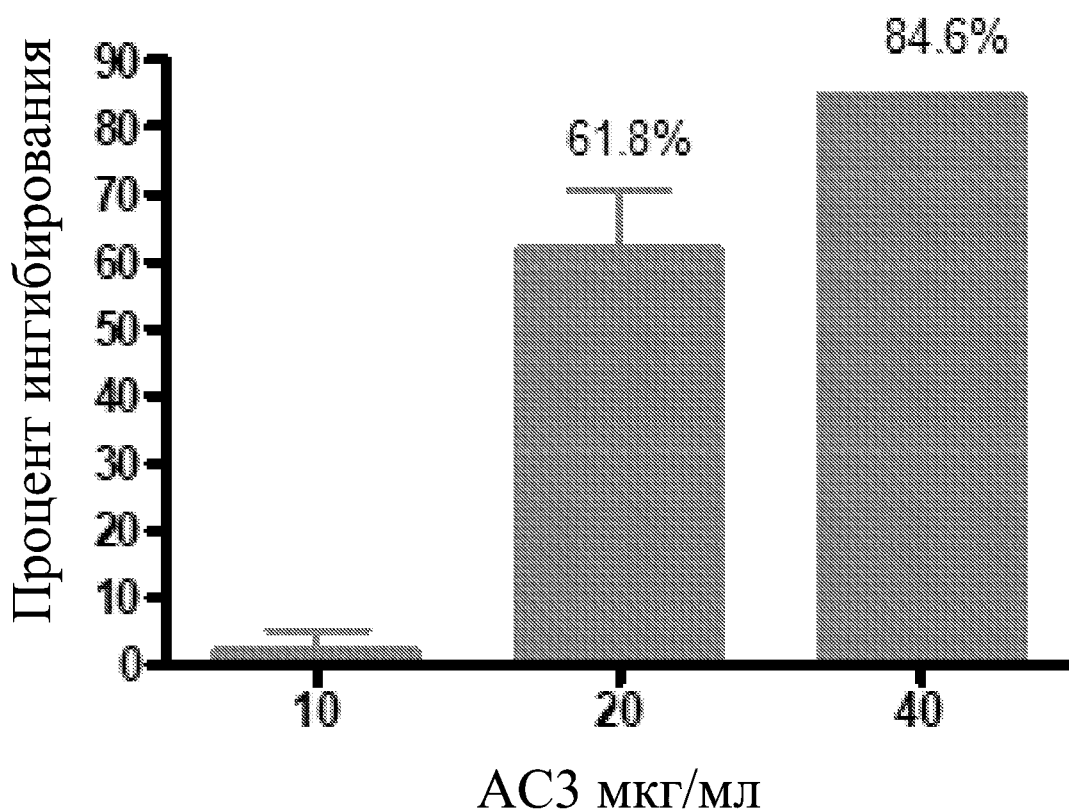


Фиг. 2

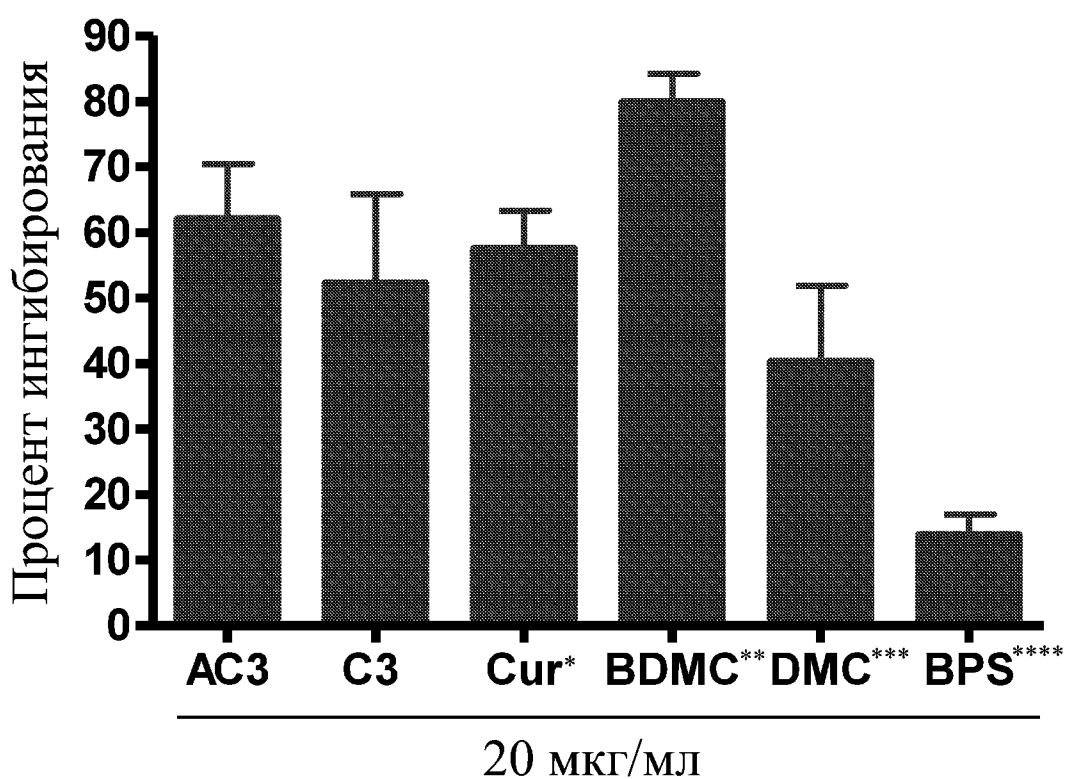


\* фибробластоподобные синовиоциты

Фиг. 3



Фиг. 4



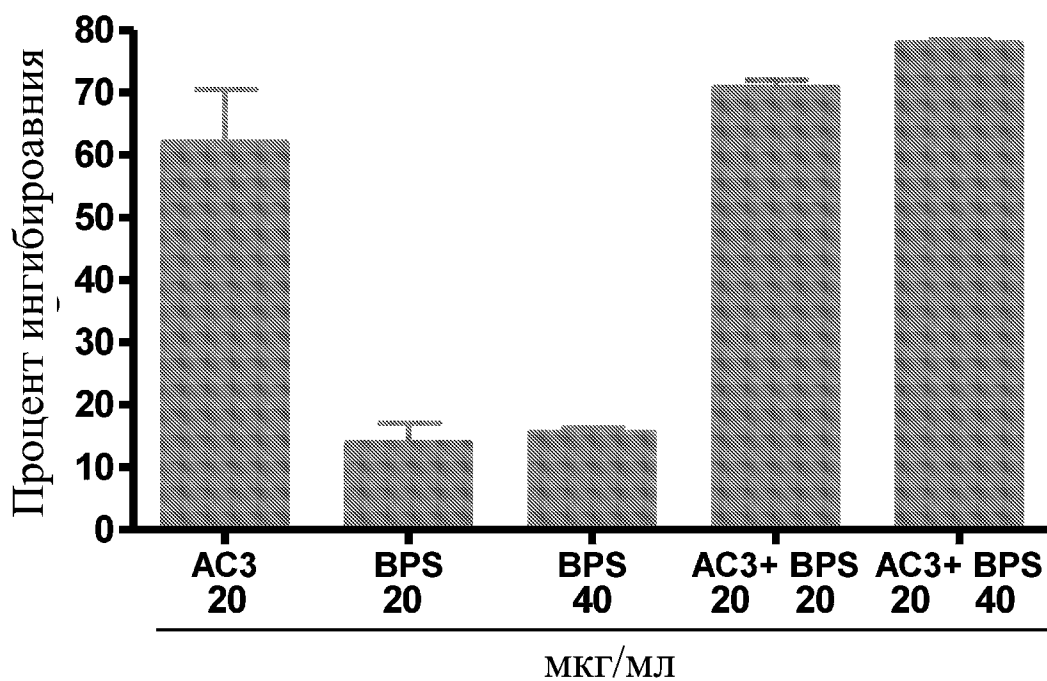
\* куркумин

\*\* бисдеметоксикуркумин

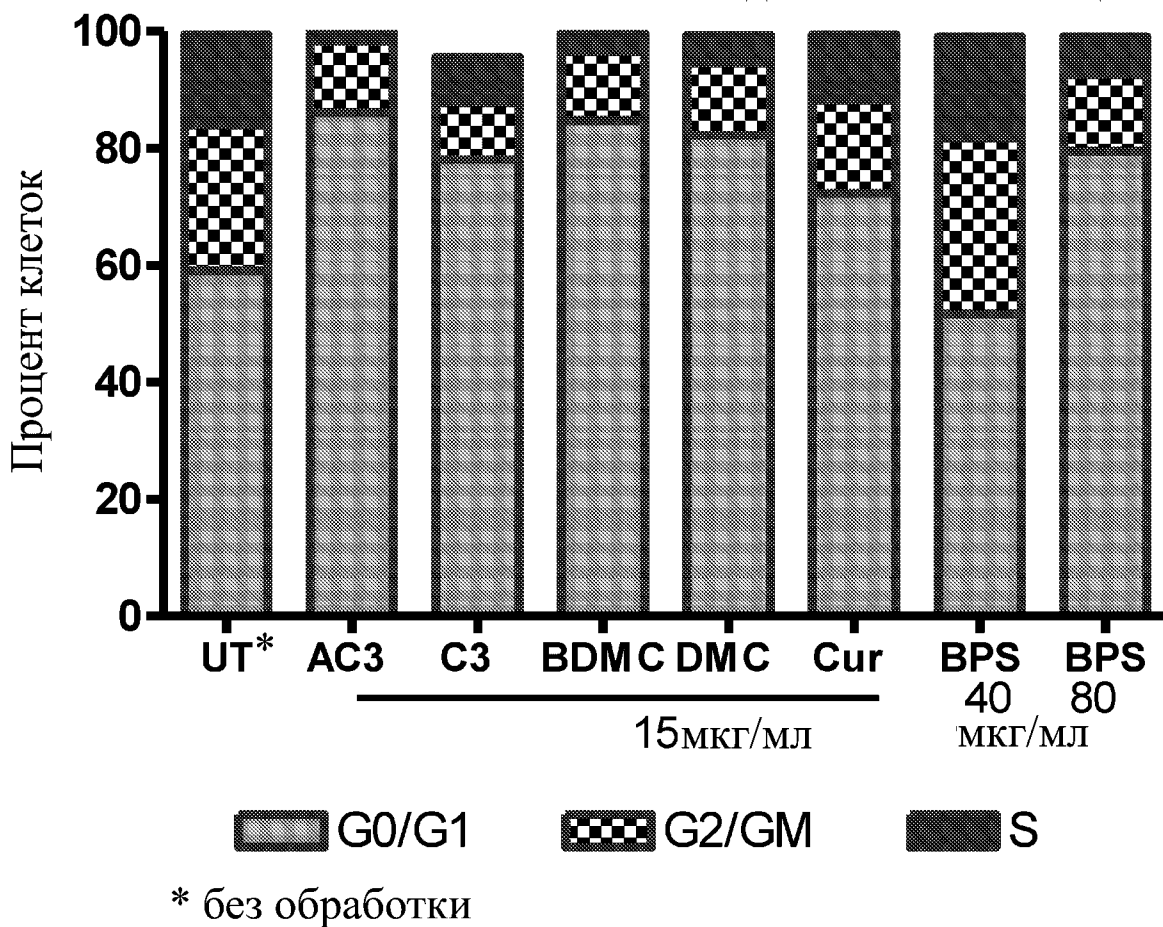
\*\*\* деметоксикуркумин

\*\*\*\* босвеллиевые кислоты и полисахариды

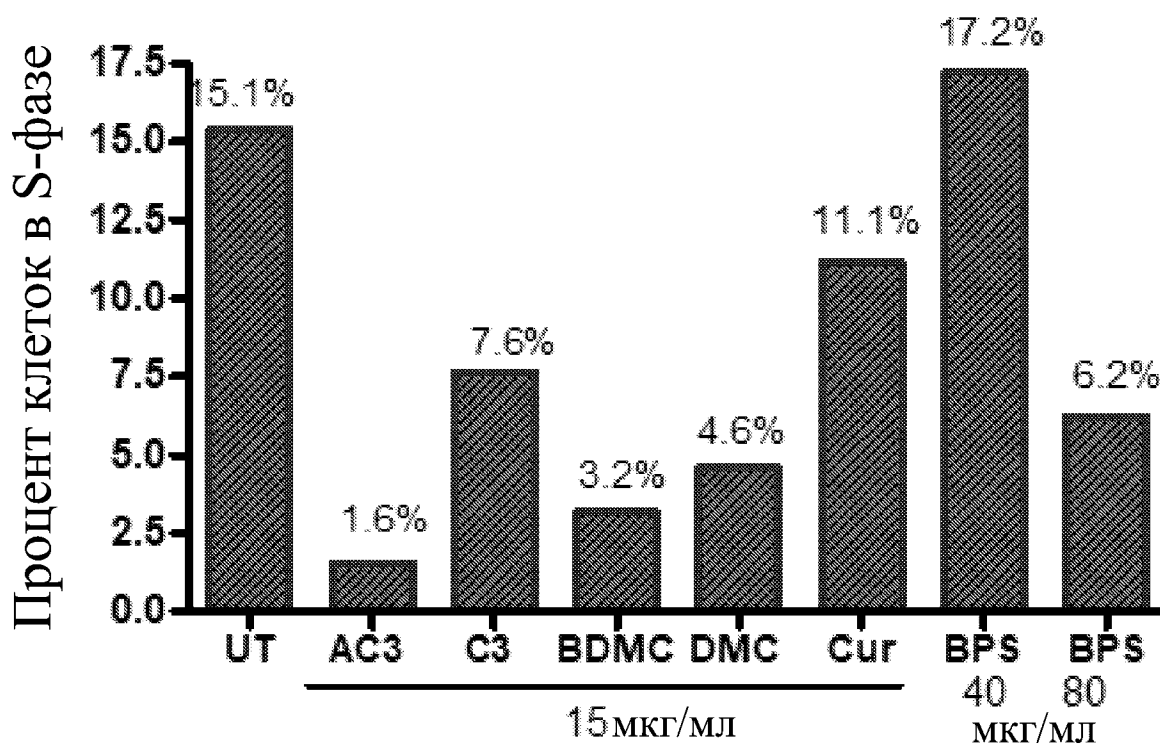
Фиг. 5



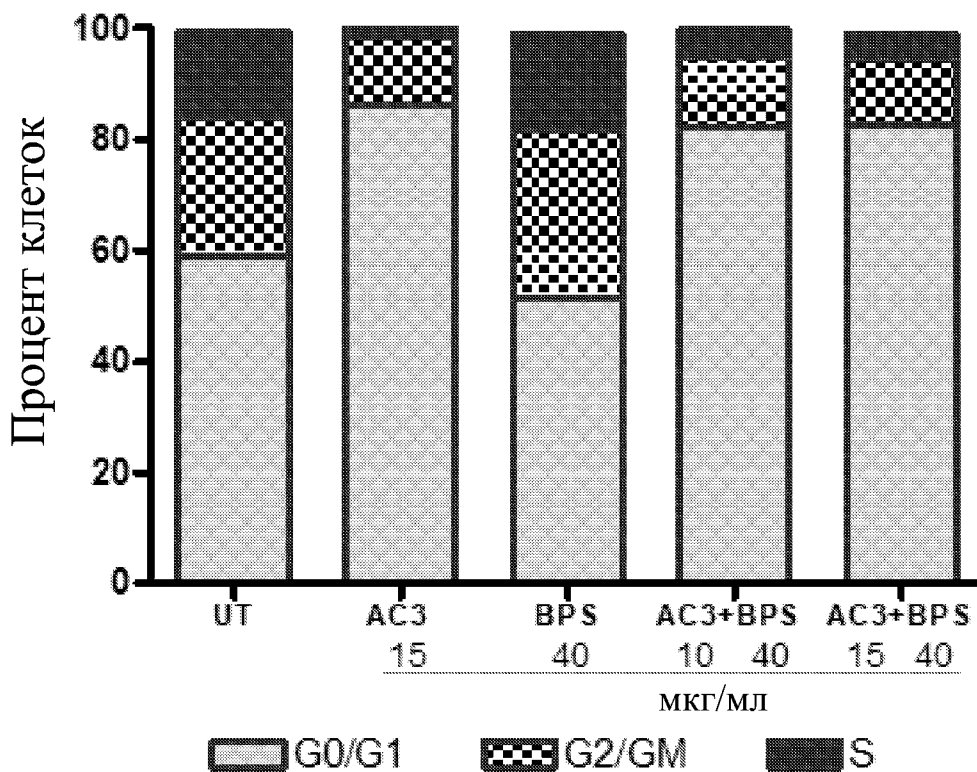
Фиг. 6



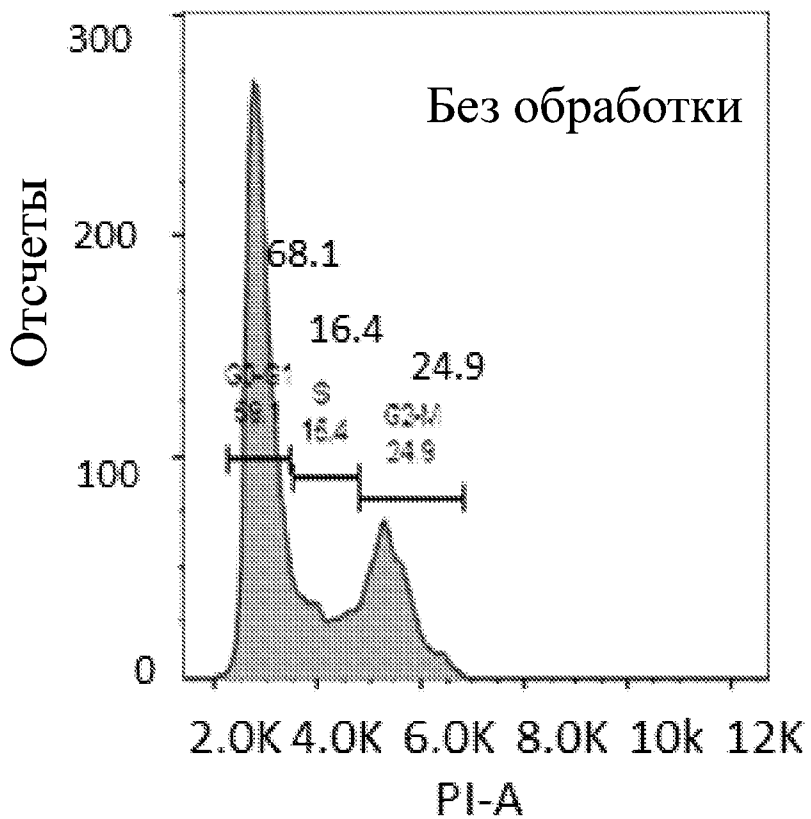
Фиг. 7



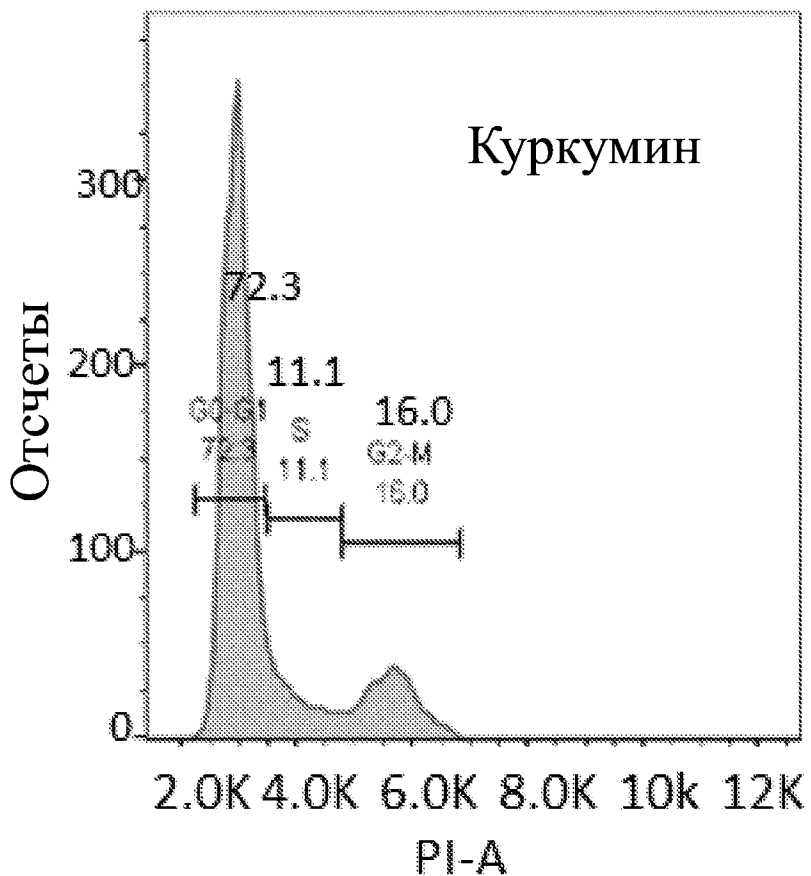
Фиг. 8



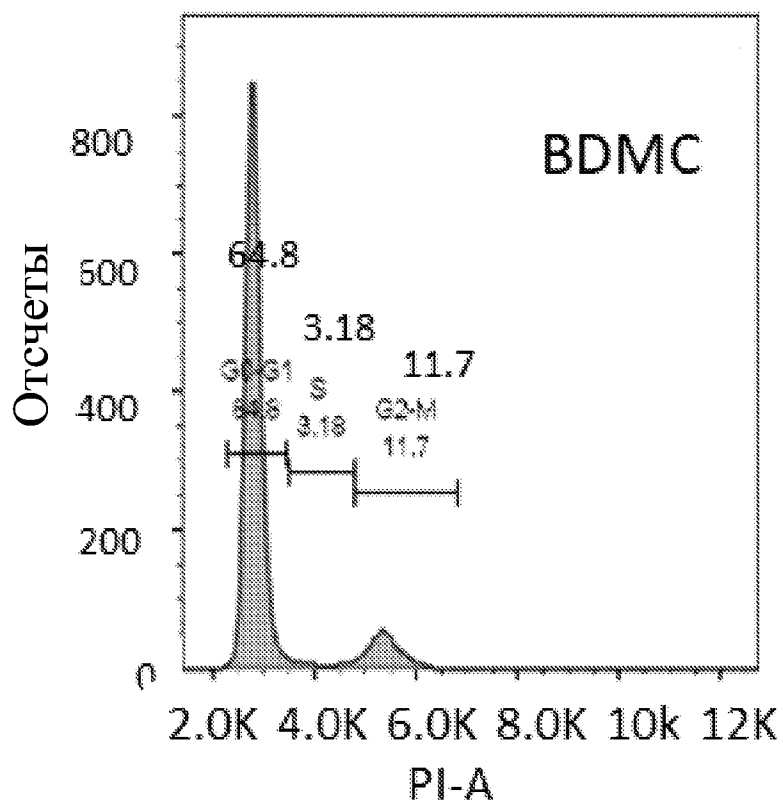
Фиг. 9



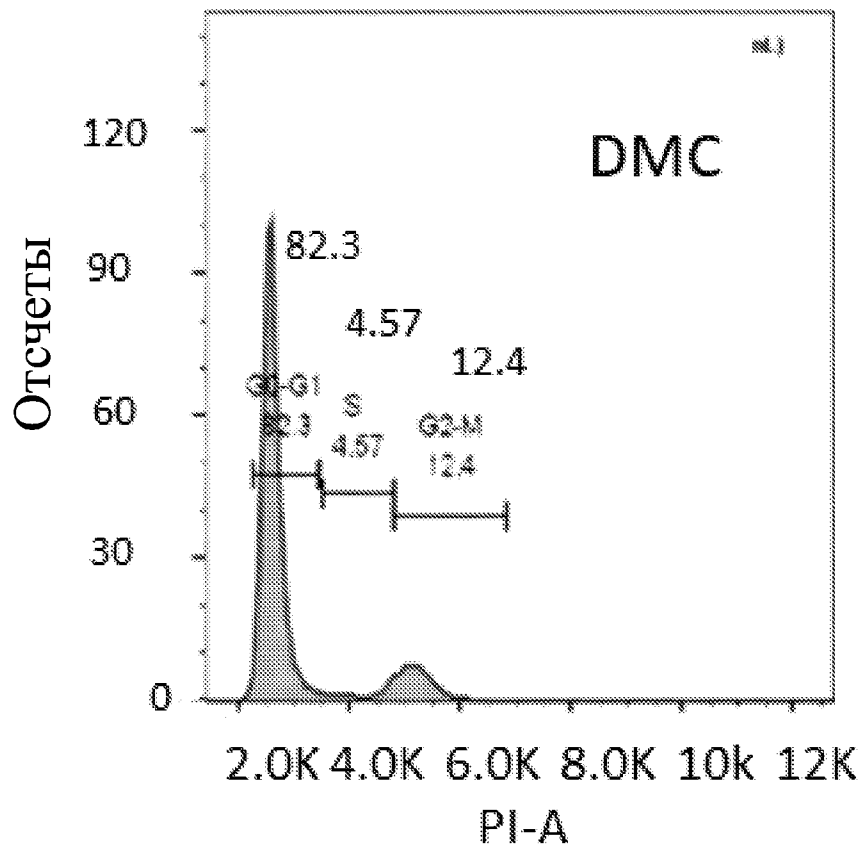
Фиг. 10



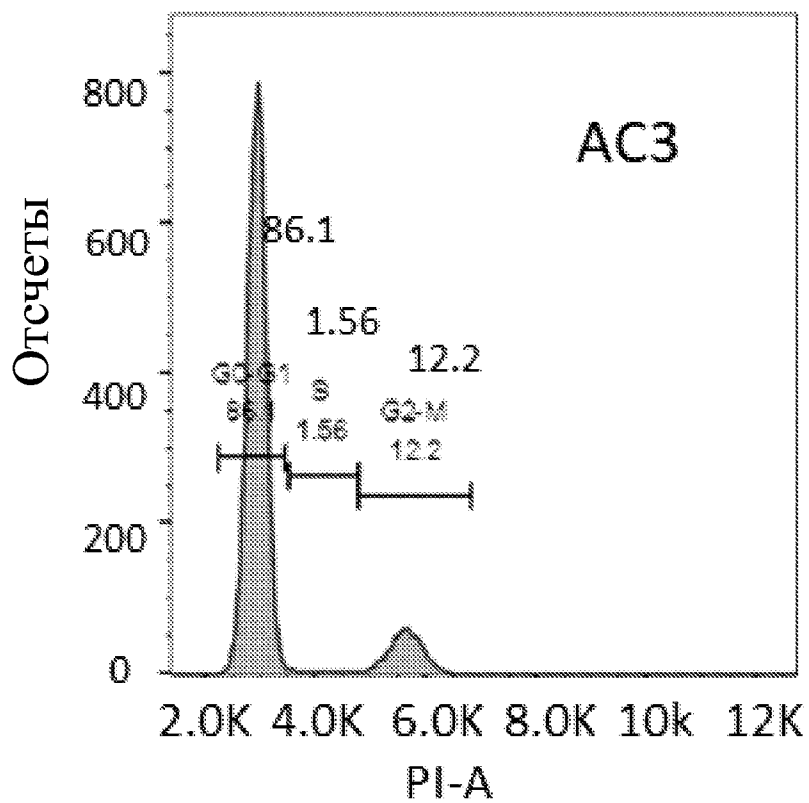
Фиг. 11



Фиг. 12

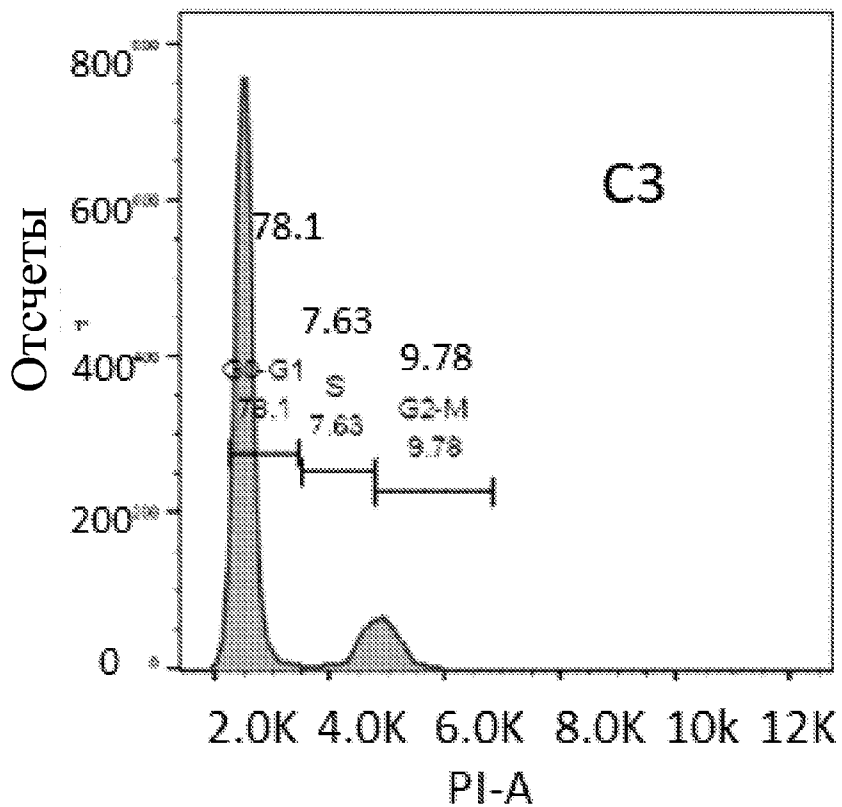


Фиг. 13

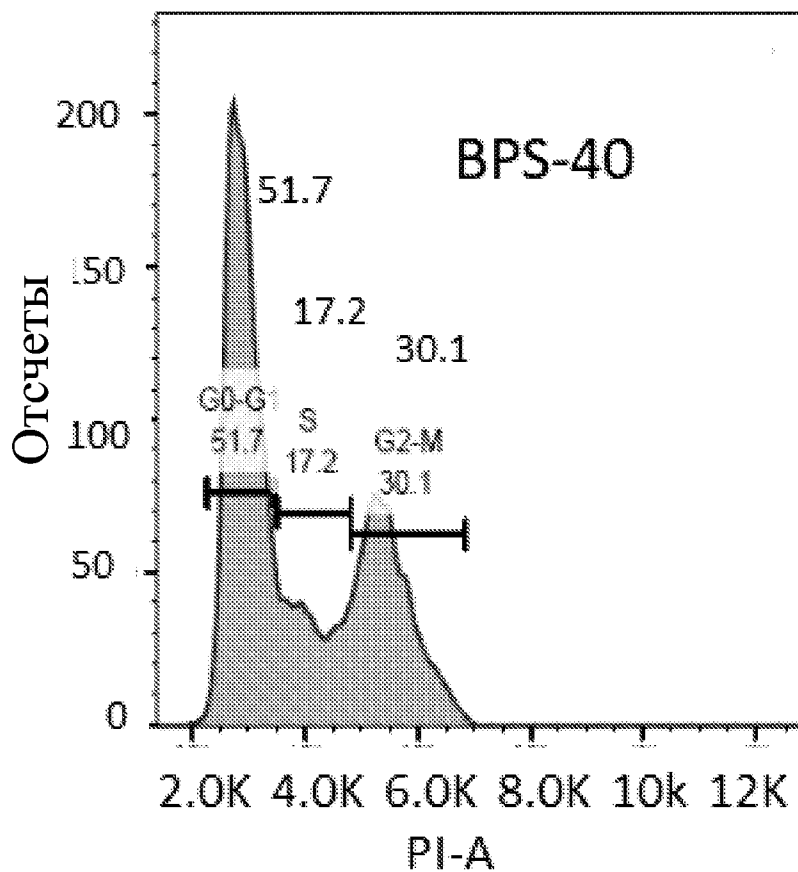


Фиг. 14

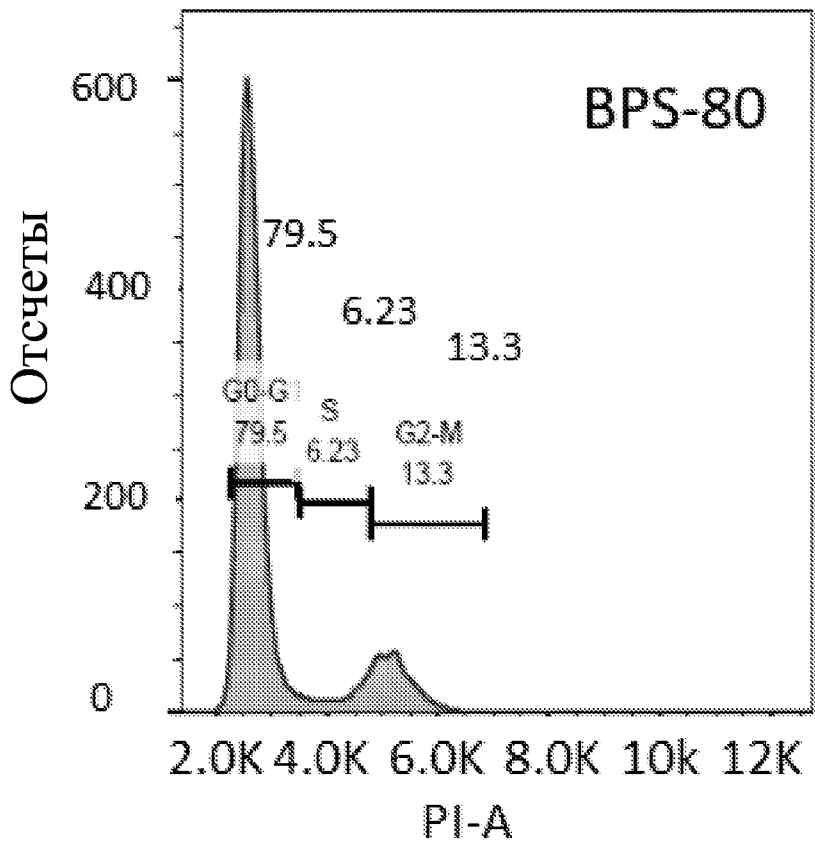




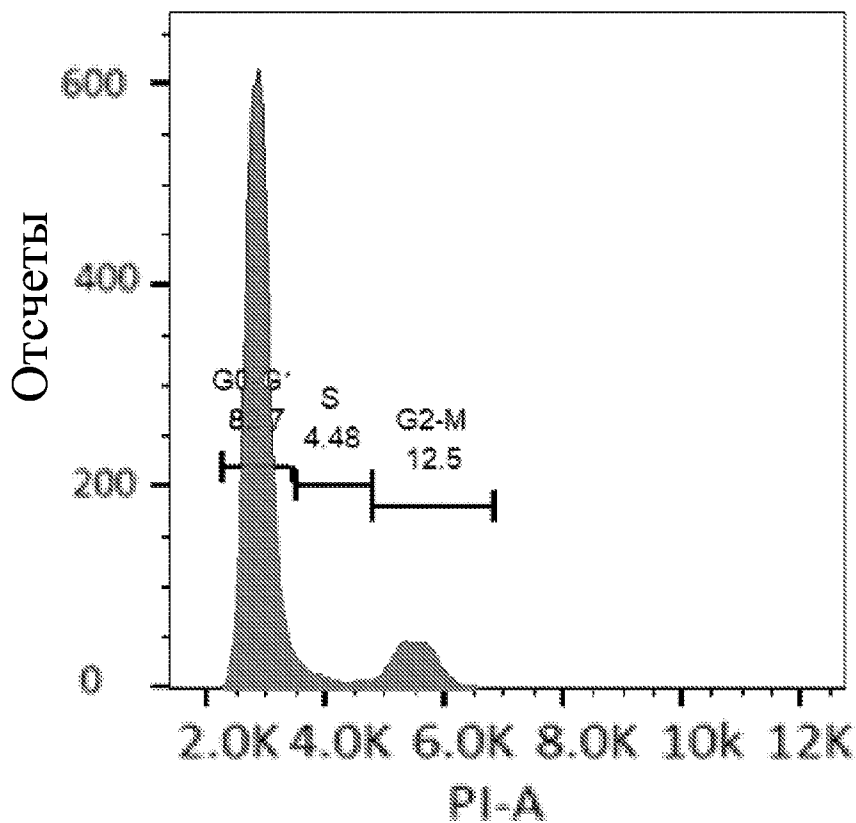
Фиг. 15



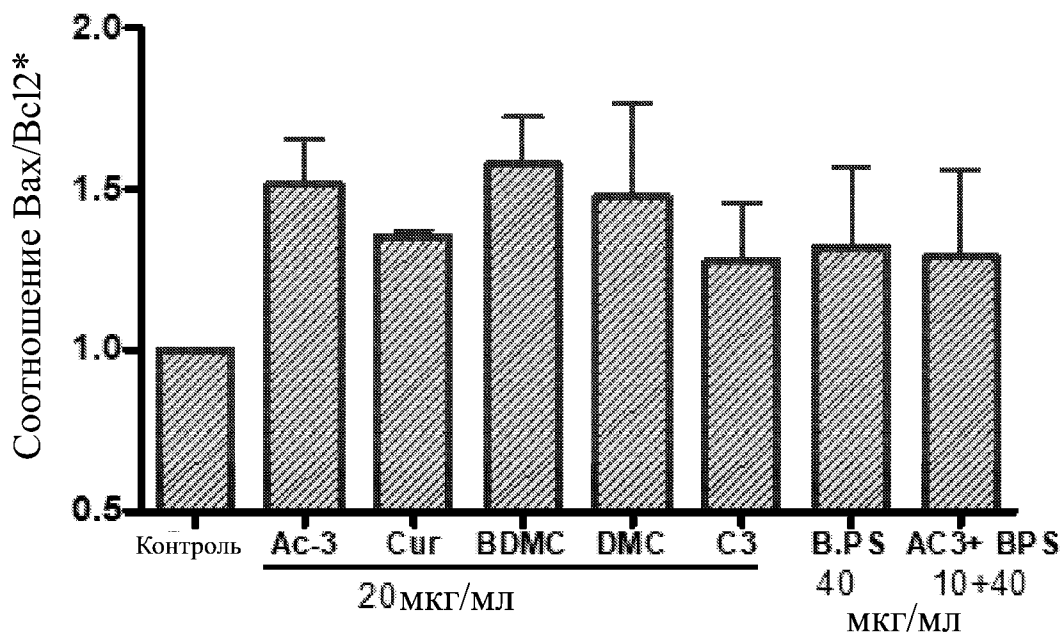
Фиг. 16



Фиг. 17

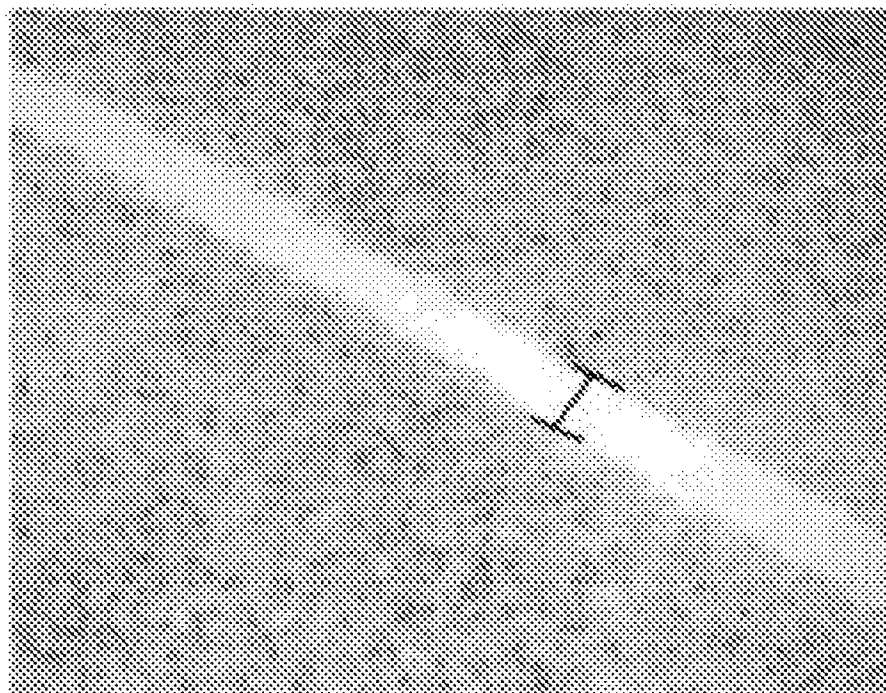


Фиг. 18

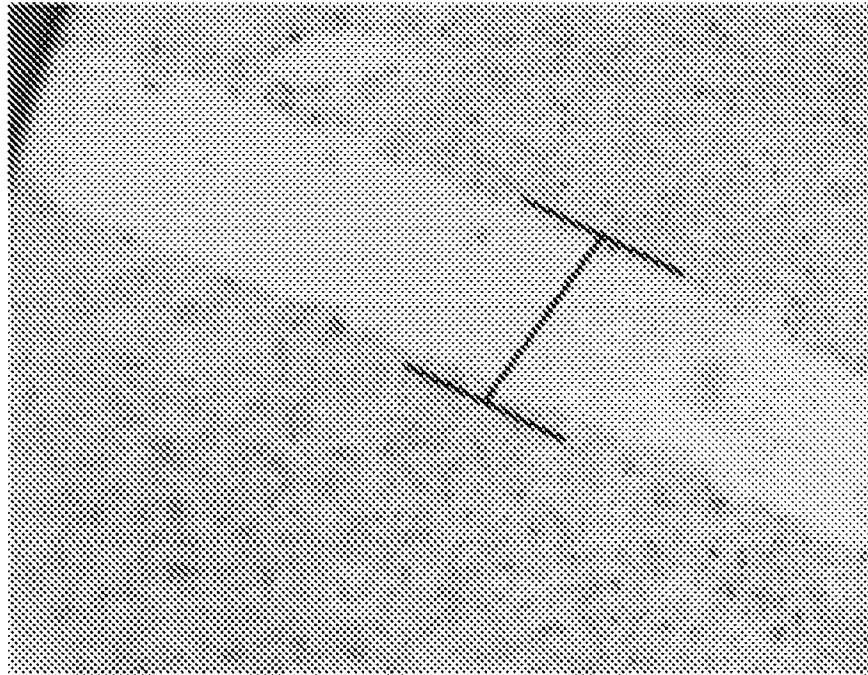


\* Vβ2 - белок В-клеточной лимфомы 2, Vα4 - Vβ2-подобный белок 4

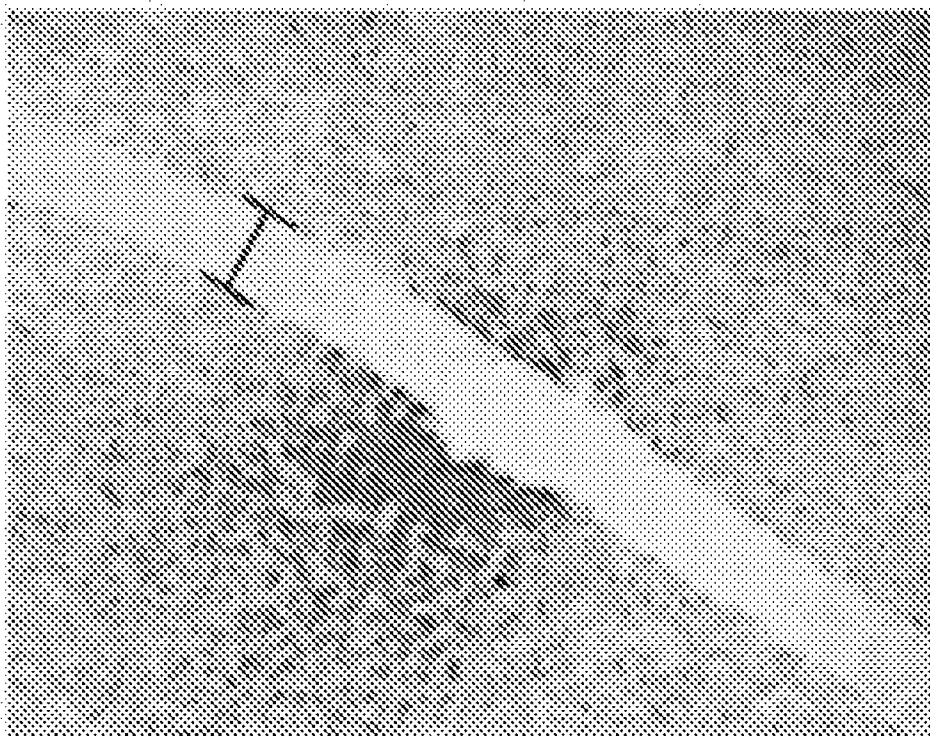
Фиг. 19



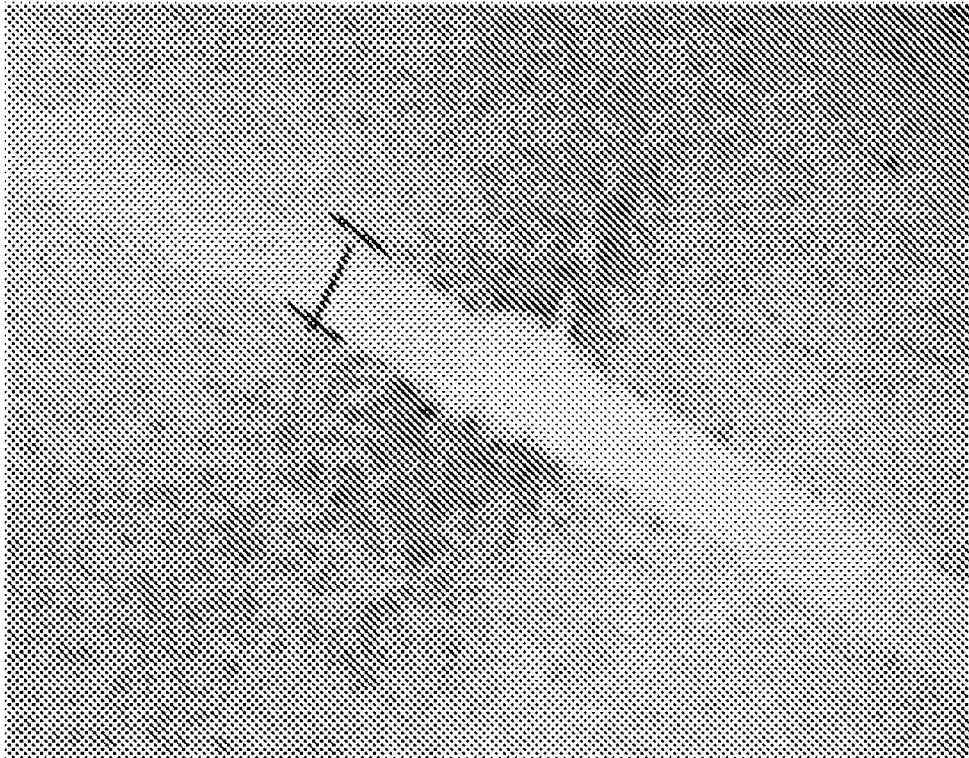
Фиг. 20



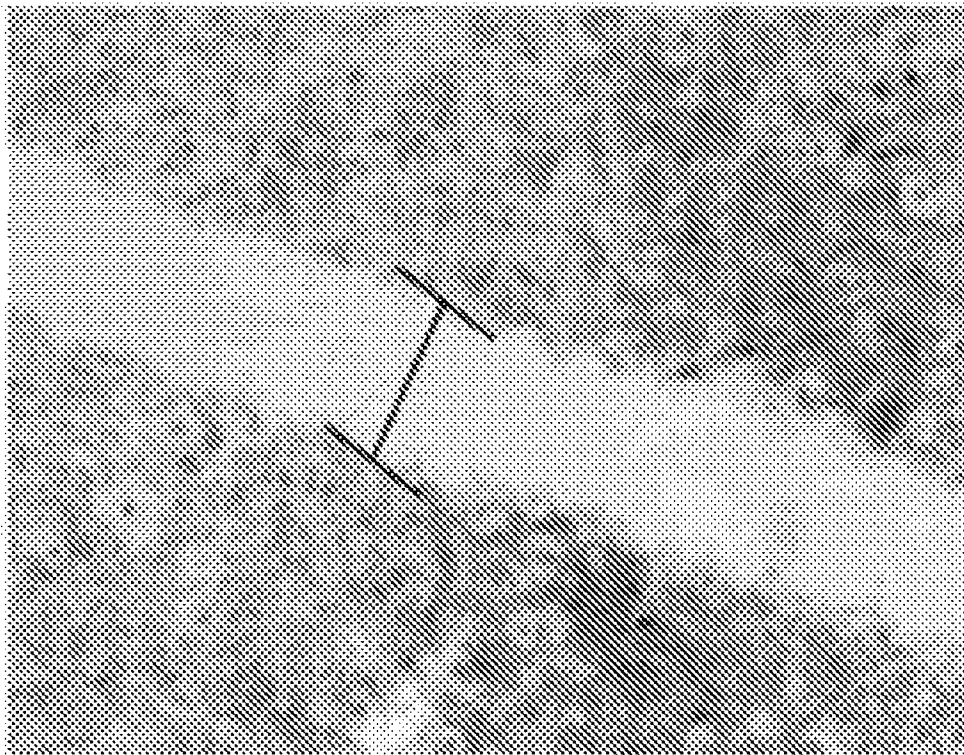
Фиг. 21



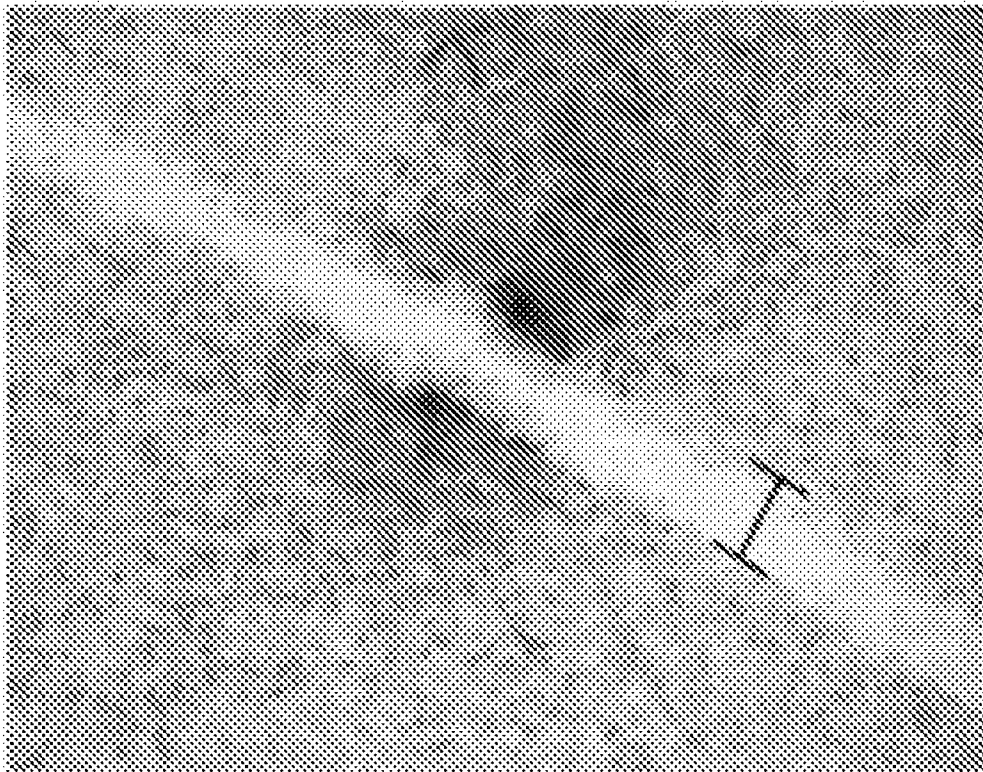
Фиг. 22



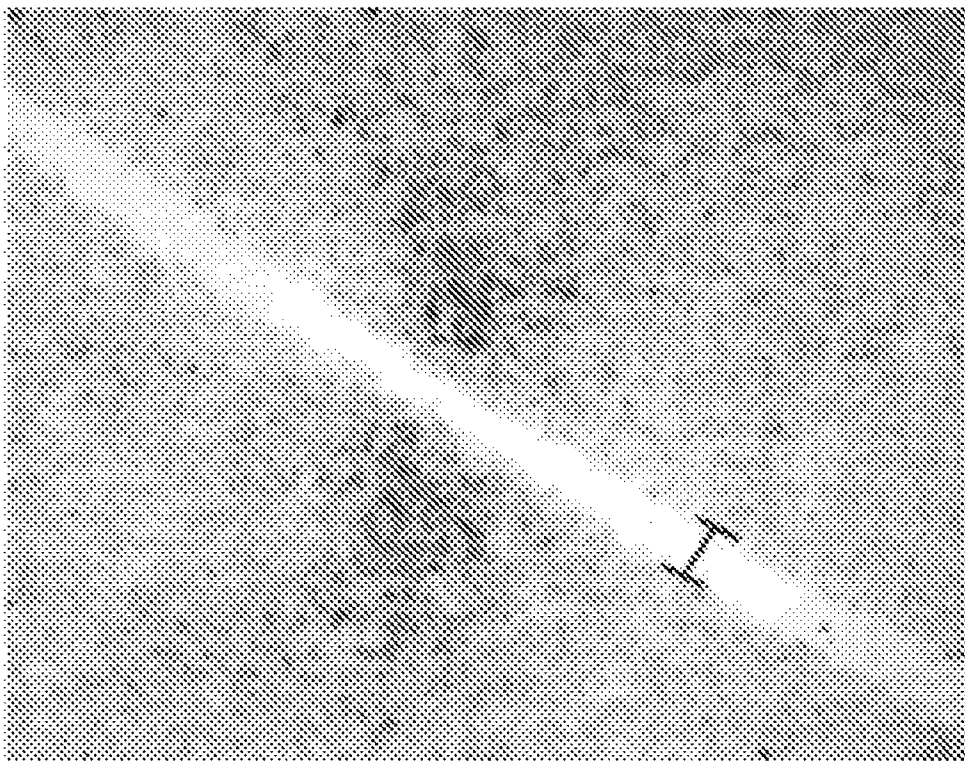
Фиг. 23



Фиг. 24

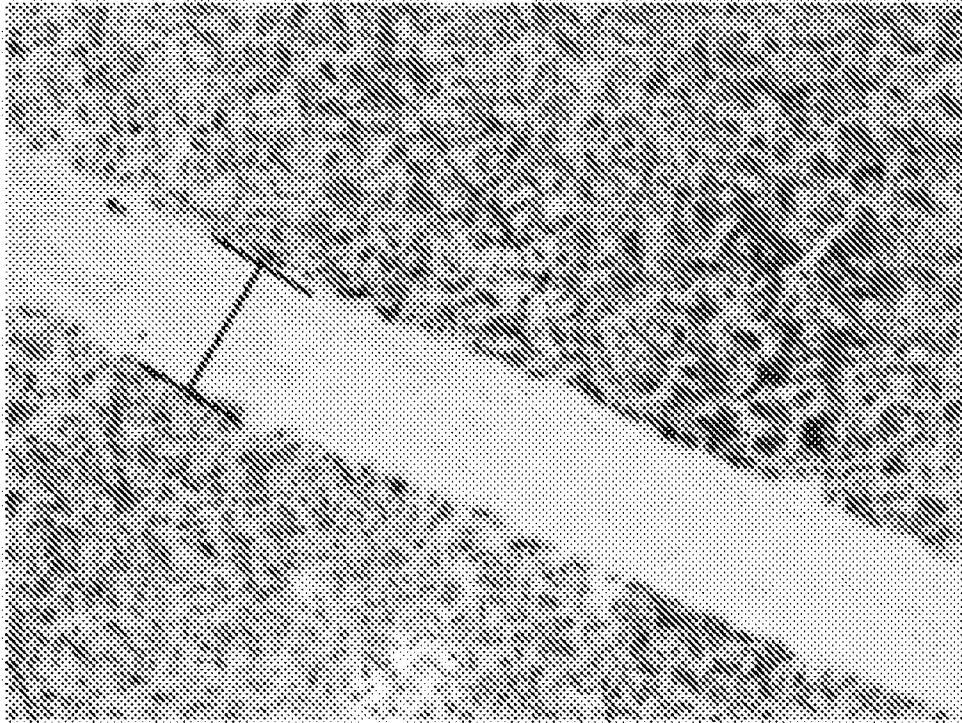


Фиг. 25

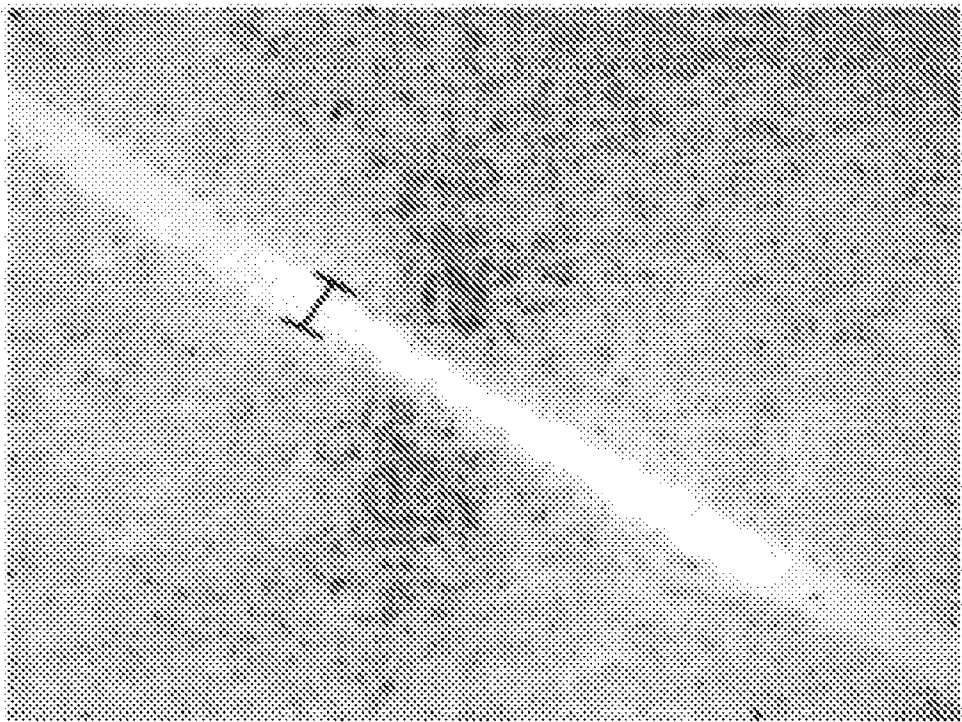


Фиг. 26

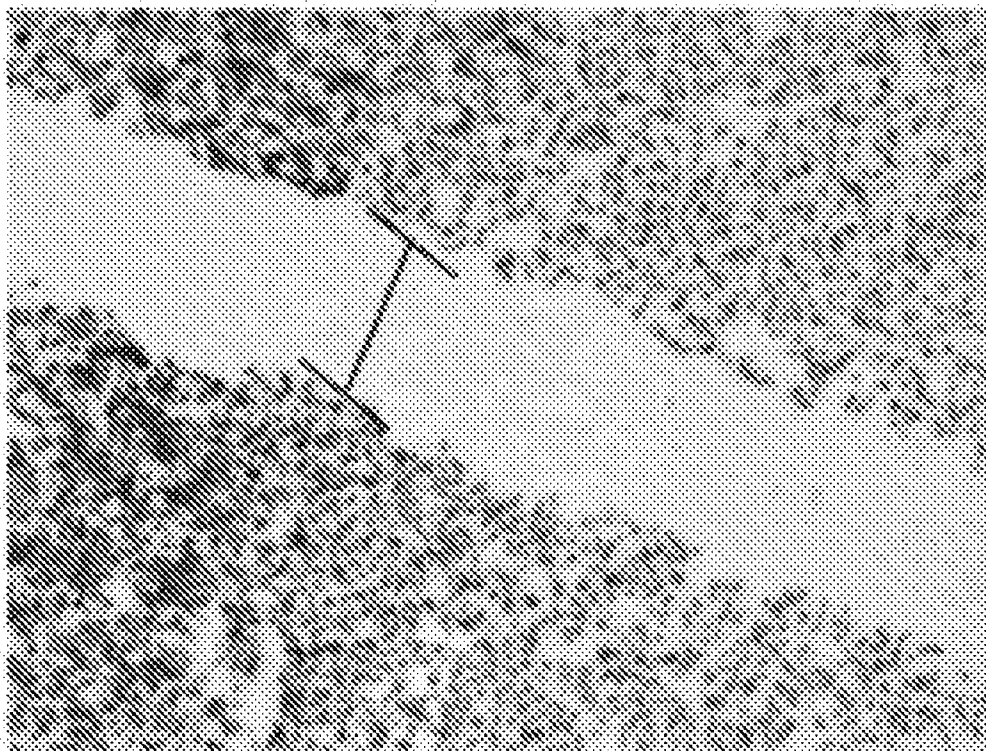




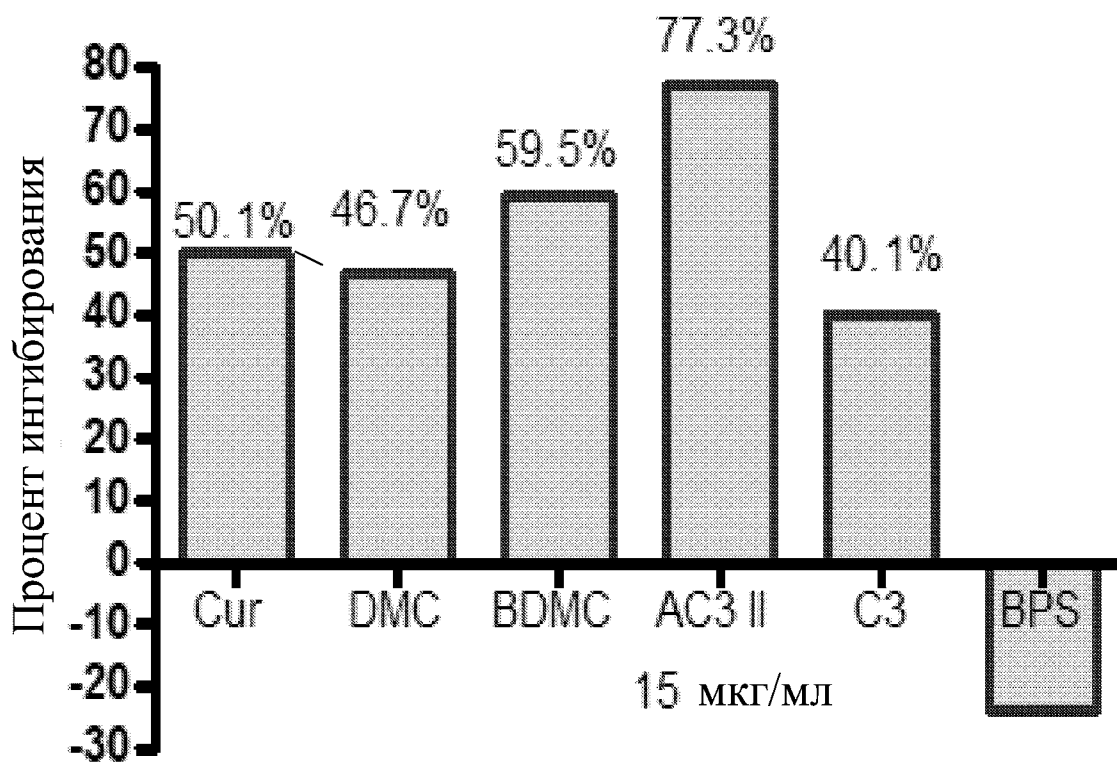
Фиг. 27



Фиг. 28

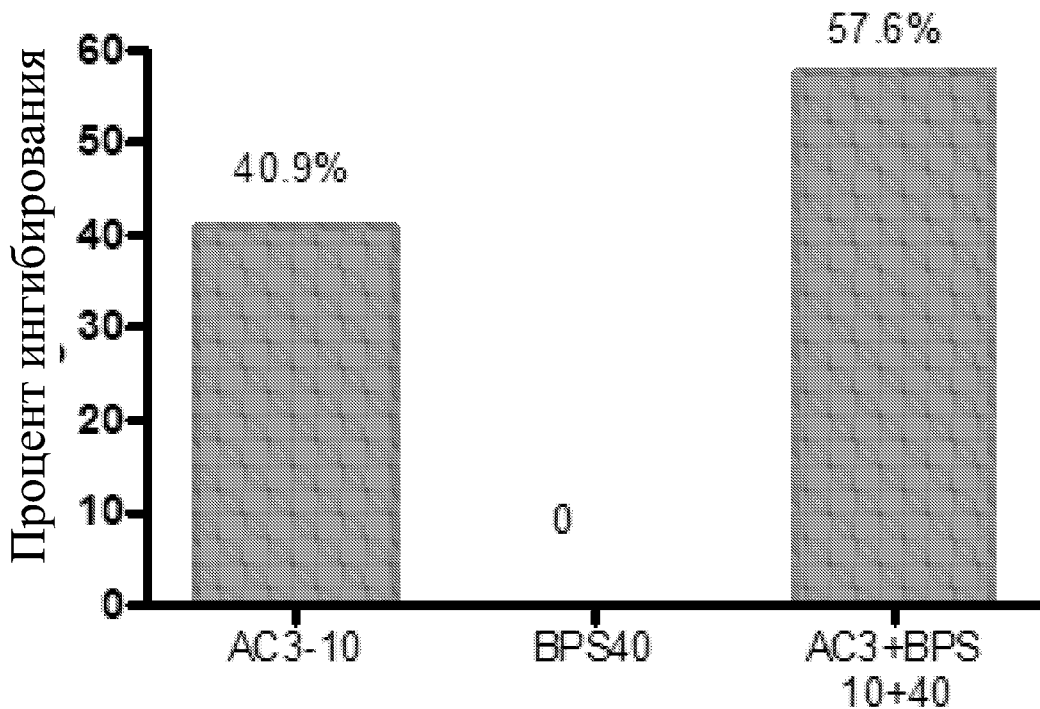


Фиг. 29

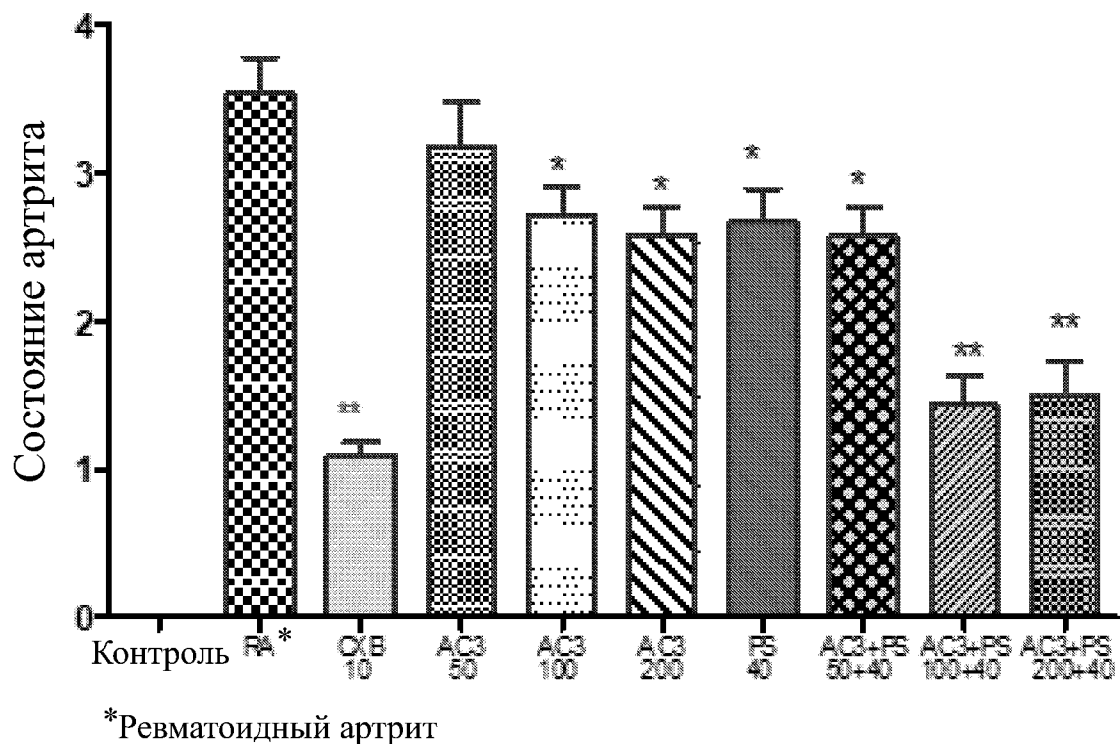


Фиг. 30

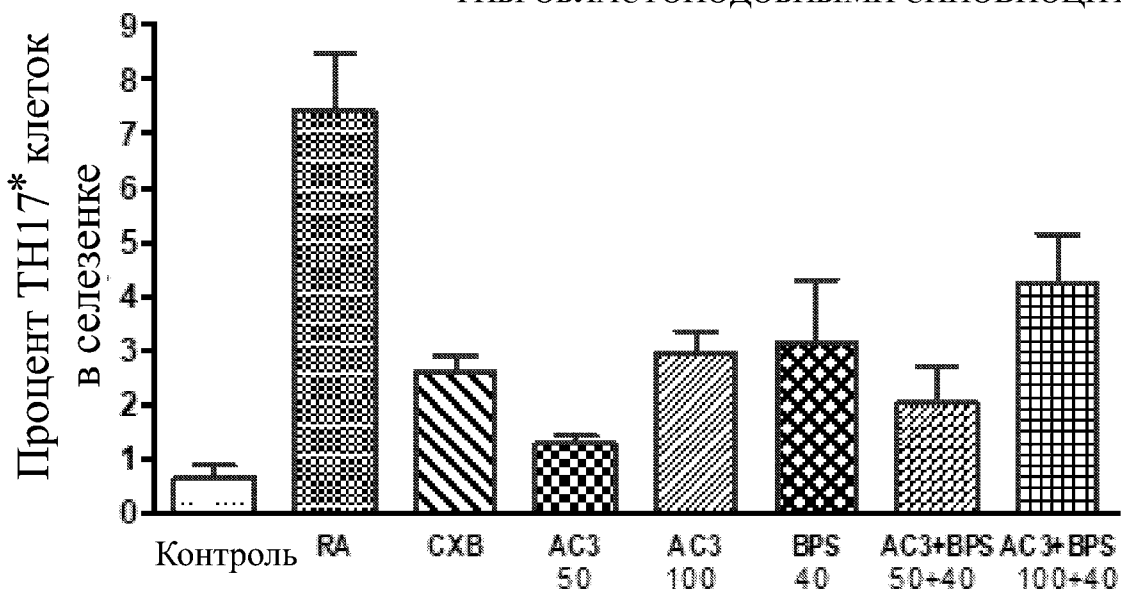




Фиг. 31

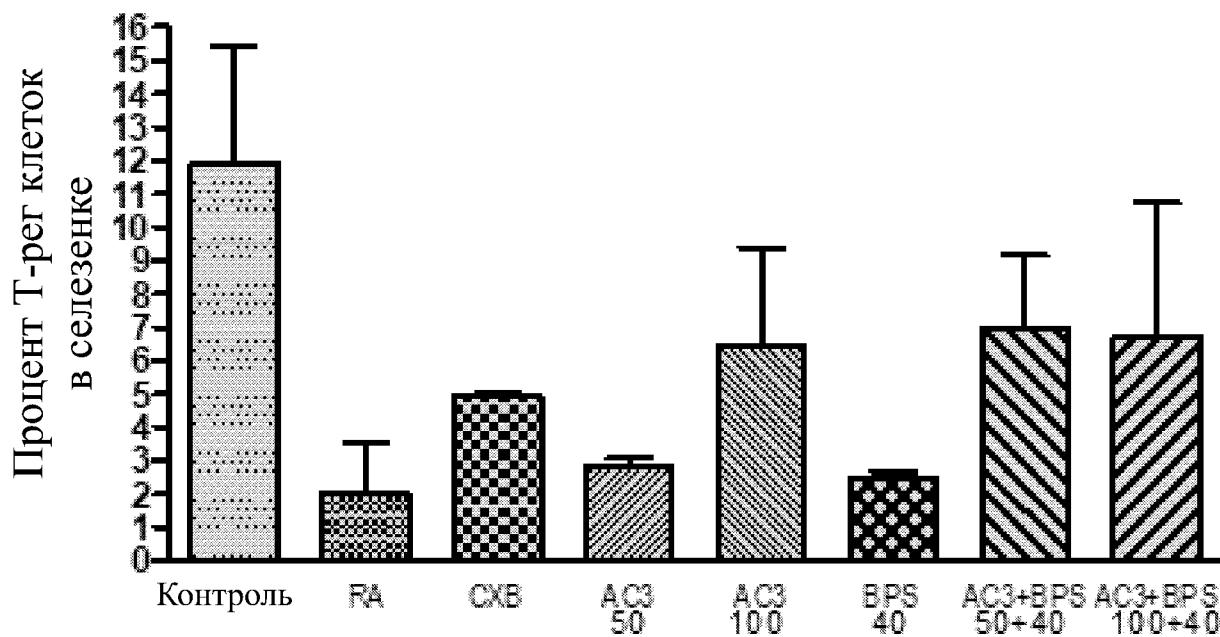


Фиг. 32

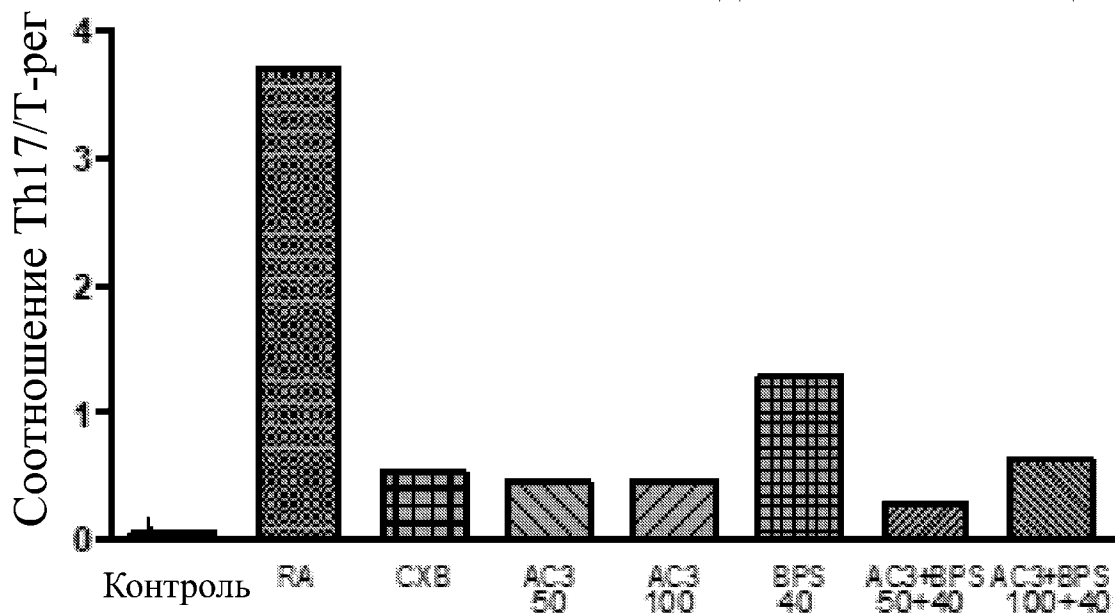


\* Т-хелперы 17

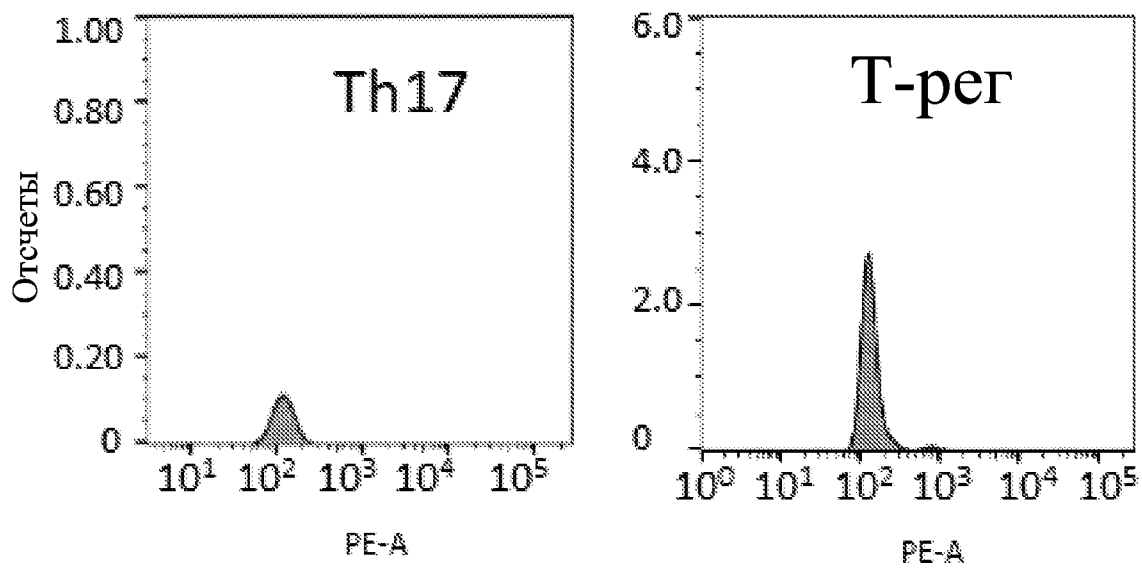
Фиг. 33



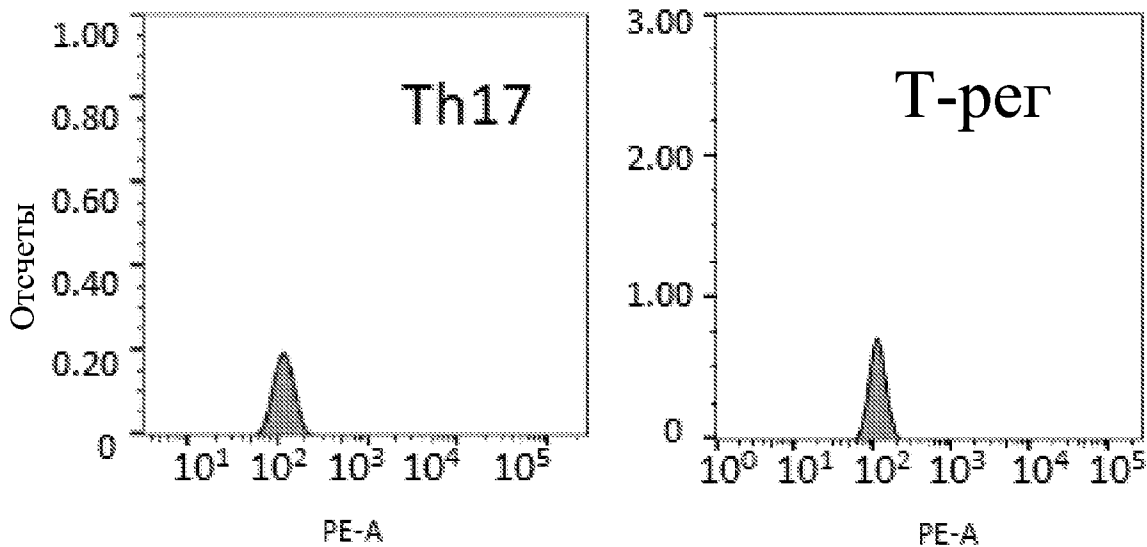
Фиг. 34



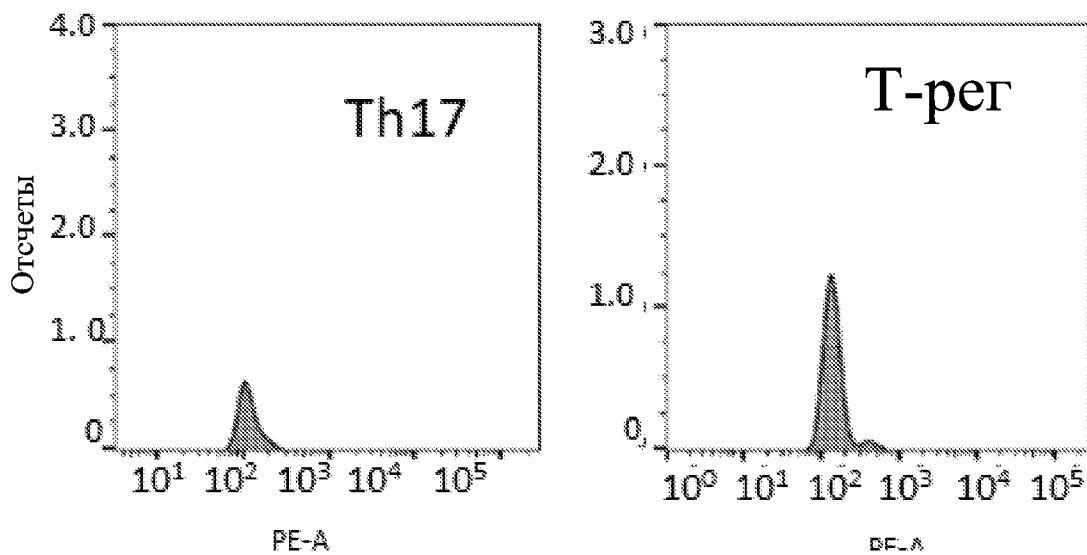
Фиг. 35



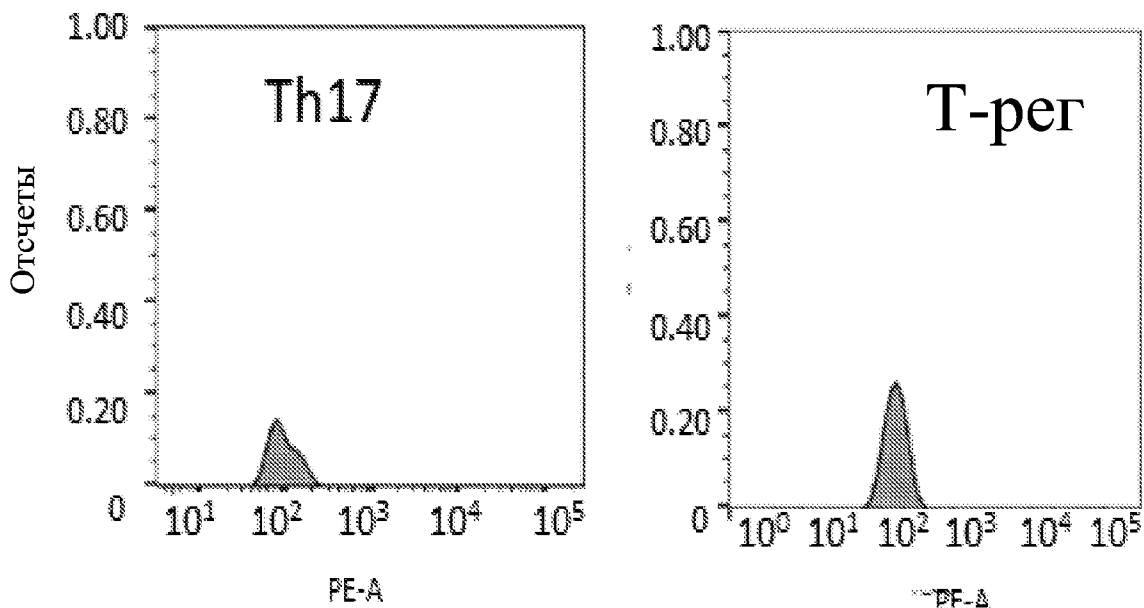
Фиг. 36



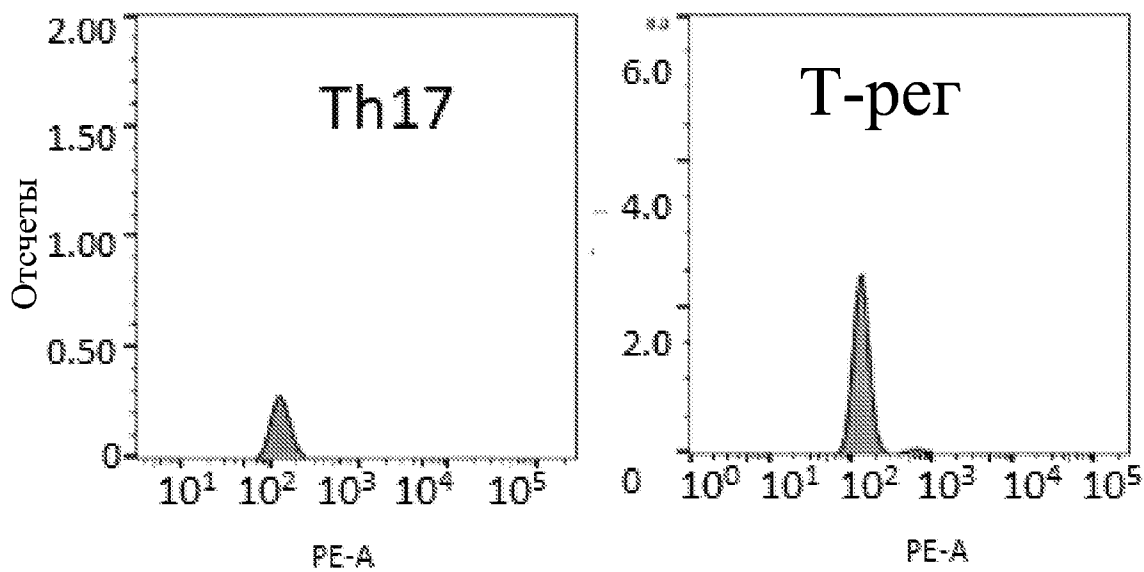
Фиг. 37



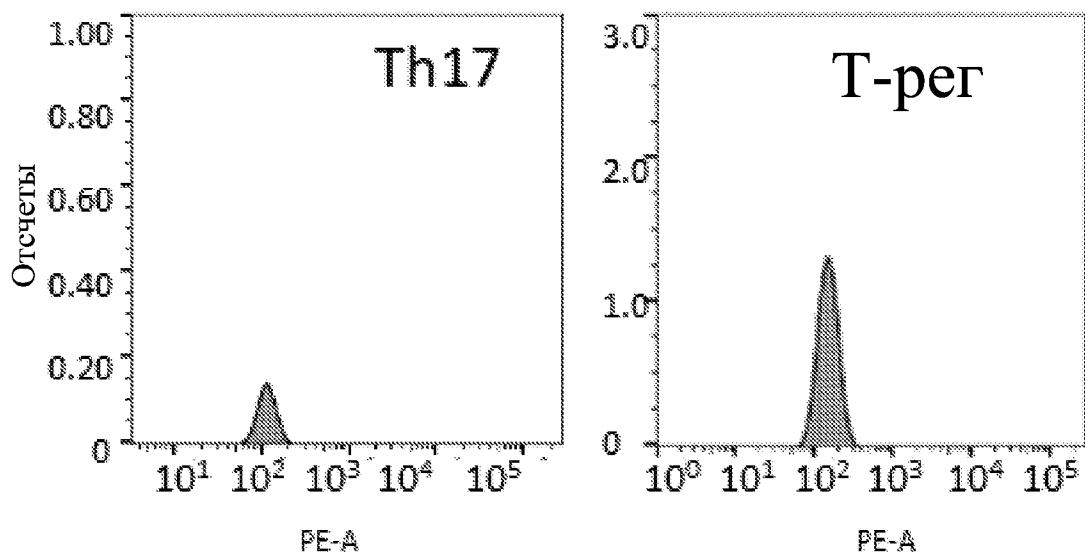
Фиг. 38



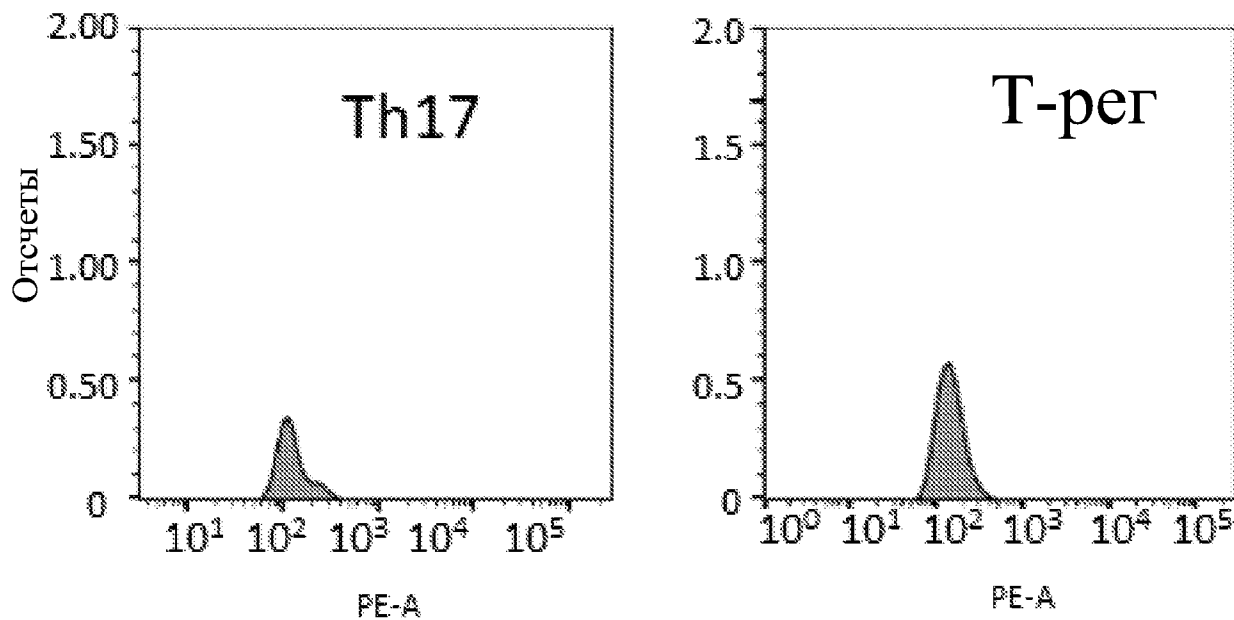
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42