(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201591996 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.02.29

(22) Дата подачи заявки
2014.04.17

(51) Int. Cl. ***C07D 493/14*** (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЫ

(31) **2013901359**
(32) **2013.04.18**
(33) **AU**
(86) **PCT/AU2014/050018**
(87) **WO 2014/169356 2014.10.23**

(71) Заявитель:
КЬЮБИОТИКС ЛИМИТЕД (AU)

(72) Изобретатель:
Редделл Пол Уоррен, Гордон Виктория Энн (AU), Мозли Райан, Стедман Роберт, Мозиз Рэйчел Луиз (GB), Бойл Глен Мэттью, Парсонс Питер Гордон (AU)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям эпокситиглиана и их применению для содействия заживлению раны. В конкретных вариантах осуществления соединения эпокситиглиана представляют собой соединения эпокситиглиаен-3-она. Описаны способы индукции или содействия заживлению ран, а также способы уменьшения рубцевания и улучшения косметических результатов при заживлении раны. Также описаны соединения и композиции, применяемые для заживления раны.

201591996 A1

201591996 A1

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЫ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к соединениям эпокси-тиглиана и их применению для содействия заживлению раны. В конкретных вариантах осуществления соединения эпокси-тиглиана представляют собой соединения эпокси-тиглиаен-3-она. Описаны способы индукции или содействия заживлению ран, а также способы уменьшения рубцевания и улучшения косметических результатов при заживлении раны. Также описаны соединения и композиции, применяемые для заживления раны.

Предпосылки изобретения

Заживление раны представляет собой сложный процесс, в котором кожа или другой орган или ткань самостоятельно восстанавливается после повреждения. Эпидермис (наружный слой) и дерма (внутренний или глубокий слой) нормальной кожи сохраняют устойчивое равновесие, образуя защитный барьер от внешней среды. При нарушении защитного барьера немедленно запускается нормальный физиологический процесс заживления раны. Классическая модель заживления раны состоит из трех последовательных, но перекрывающихся фаз, а именно: воспалительной, пролиферативной и, наконец, ремоделирования.

В воспалительной фазе заживления раны происходит активная концентрация нейтрофилов и моноцитов из окружающей сосудистой сети в рану. Нейтрофилы играют важную роль в первоначальном контроле и уничтожении бактериальных и грибковых инфекций в ране. Моноциты превращаются в макрофаги, как только они попадают в рану, где они играют множество ролей в ходе заживления раны, включая первичный фагоцитоз и удаление матричного и клеточного дебриса. Высвобождение ферментов, цитокинов и факторов роста как нейтрофилами, так и макрофагами в ране может затем оказывать значительное

влияние на другие клетки внутри раны и окружающие ткани. Например, макрофаги секретируют коллагеназы, которые очищают рану; интерлейкины и фактор некроза опухоли (TNF), которые стимулируют фибробласты и содействуют ангиогенезу; и трансформирующий фактор роста (TGF), который стимулирует кератиноциты. Они также секретируют тромбоцитарный фактор роста и фактор роста эндотелия сосудов, которые инициируют образование грануляционной ткани и, следовательно, инициируют переход в пролиферативную фазу и фазу ремоделирования. Быстрая и устойчивая, но временная воспалительная фаза часто ассоциируется с хорошими результатами заживления раны.

Второй этап заживления раны включает клеточную пролиферацию и миграцию, и контракцию раны. Это включает действия, предпринятые клетками в ране, которые обеспечивают закрытие раневого отверстия и пополнения утраченной ткани. Миграция и пролиферация кератиноцитов является основополагающей в достижении эпителизации раны вновь, в то время как восстановление эффектов, лежащих в основе дермы, в результате миграции, пролиферации и дифференциации фибробластов помогает закрыть рану и способствует синтезу, построению и выравниванию коллагеновых волокон.

На заключительной стадии ремоделирования мигрирующие и с пролиферативной активностью кератиноциты заново наслаиваются на краю раны с целью закрытия раны и образования сплошного эпидермиса. На этом этапе также происходит много изменений в дерме, включающих ремоделирование внеклеточного матрикса для восстановления нормальной структуры кожи и сосудистой сети.

В некоторых случаях раны могут заживать медленно или не заживают вообще. Многие факторы влияют на заживление раны, например, общее состояние здоровья субъекта с раной, возраст субъекта с раной, такие заболевания, как сахарный диабет или другие заболевания, которые могут повлиять на

циркуляцию, наличие инфекции, чужеродных веществ или некротической ткани, или в некоторых случаях лечение может влиять на скорость заживления раны.

Кроме того, при некоторых ранах незавершенное регулирование заживления раны может привести к фиброзу и чрезмерному формированию рубца, после чего остается рубцовая ткань, функциональные и косметические результаты которой неполноценные по отношению к нормальной ткани.

Существует много исследований по улучшению заживления раны и уменьшению рубцовой ткани. Тем не менее, существует необходимость поиска средств, способных содействовать заживлению раны, например, увеличивая скорость заживления раны, особенно при хронических ранах. Существует также потребность в средствах, которые позволяют ране заживать с уменьшенным рубцеванием, чем при естественном процессе.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии, что экстракты из растений, которые содержат соединения эпокси-тиглиана, способны содействовать заживлению раны, а также уменьшают образование рубцовой ткани при заживлении раны.

В первом аспекте по настоящему изобретению предложен способ содействия заживлению раны у субъекта, включающий введение субъекту соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана представлено в форме растительного экстракта, главным образом спиртового экстракта. В некоторых вариантах осуществления экстракт растения можно получить из или получен из растения, которое представляет собой виды *Fontainea* или виды *Hylandia*. В некоторых вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана выделено из растительного экстракта. В других вариантах

осуществления соединение эпокси-тиглиана представляет собой синтетическое или полусинтетическое производное выделенного соединения тиглиана.

В некоторых вариантах осуществления содействие заживлению раны включает увеличение скорости заживления раны. В некоторых вариантах осуществления содействие заживлению раны включает уменьшение рубцевания в ткани раны. В некоторых вариантах осуществления содействие заживлению раны включает как увеличение скорости заживления раны, так и уменьшение рубцевания в ткани раны. В некоторых вариантах осуществления рана представляет собой хроническую рану, острую рану или существующую рану.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения чрезмерного рубцевания, включающий применение по отношению к ране или шраму соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления чрезмерное рубцевание представляет собой келоидный или гипертрофический рубец.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для содействия заживлению раны у субъекта.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли для содействия заживлению раны у субъекта.

Описание изобретения

Определения

Если не определено иначе, все технические и научные выражения, используемые в данном документе, имеют то же значение, обычно понимаемое специалистами в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном

документе, могут быть использованы в практике или при тестировании настоящего изобретения, при этом были описаны предпочтительные способы и материалы. В контексте настоящего изобретения следующие выражения определены ниже.

Формы существительного единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е., по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. В качестве примера "элемент" означает один элемент или несколько элементов.

Применяемое в данном документе выражение "приблизительно" относится к количеству, уровню, значению, измерению, размеру или величине, которое варьирует в пределах 30%, 25%, 20%, 15% или 10% по отношению к исходному количеству, уровню, значению, измерению, размеру или величине.

В данном описании, если контекст не требует иного, слова "содержать", "содержит" или "содержащий" следует понимать как, подразумевающий включение указанной стадии, или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов.

Выражение "алкил" относится к необязательно замещенным линейным и разветвленным углеводородным группам, содержащим от 1 до 20 атомов углерода. При необходимости, алкильная группа может содержать определенное количество атомов углерода, например, C_1-C_6 алкил, который включает алкильные группы, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейных или разветвленных расположениях. Не ограничивающие примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, s- и t-бутил, пентил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, гексил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2-этилбутил, 3-этилбутил, гептил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил и пентадецил.

Выражение "алкенил" относится к необязательно замещенным ненасыщенным линейным или разветвленным углеводородам, содержащим от 2 до 20 атомов углерода и содержащим по меньшей мере одну двойную связь. При необходимости, алкенильная группа может содержать определенное количество атомов углерода, например, C_2-C_6 алкенил, который включает алкенильные группы, содержащие 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейных или разветвленных расположениях. Не ограничивающие примеры алкенильных групп включают этенил, пропенил, изопропенил, бутенил, s- и t-бутенил, пентенил, гексенил, гепта-1,3-диен, гекса-1,3-диен, нон-1,3,5-триен и тому подобное.

Выражение "алкинил" относится к необязательно замещенным ненасыщенным линейным или разветвленным углеводородам, содержащим от 2 до 20 атомов углерода, содержащим по меньшей мере одну тройную связь. При необходимости, алкинильная группа может содержать определенное количество атомов углерода, например, C_2-C_6 алкинил, который включает алкинильные группы, содержащие 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейных или разветвленных расположениях. Не ограничивающие примеры включают этинил, пропинил, бутинил, пентинил и гексинил.

Выражения "циклоалкил" и "карбоциклический" относятся к необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным моноциклическим, бициклическим или трициклическим углеводородным группам. При необходимости, циклоалкильная группа может содержать определенное количество атомов углерода, например, C_3-C_6 циклоалкил представляет собой карбоциклическую группу, содержащую 3, 4, 5 или 6 атомов углерода. Не ограничивающие примеры могут включать циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексадиенил и тому подобное.

"Арил" означает C_6-C_{14}-членную моноциклическую, бициклическую или трициклическую карбоциклическую кольцевую систему, содержащую до 7

атомов в каждом кольце, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают без ограничения фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. Арил может содержать 1-3 бензольных кольца. Если присутствуют два или несколько ароматических кольца, то кольца могут быть конденсированы вместе, при этом соседние кольца имеют общую связь.

Каждый алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил и арил, независимо отдельный это структурный элемент или часть более крупного структурного элемента, может быть необязательно замещен одним или несколькими необязательными заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_{1-6}алкил, C_{2-6}алкенил, C_{3-6}циклоалкил , оксо (=O), -OH, -SH, C_{1-6}ааалкилO-, C_{2-6}алкенилO-, C_{3-6}циклоалкилO-, C_{1-6}алкилS-, C_{2-6}алкенилS-, C_{3-6}циклоалкилS-, $-CO_2H$, $-CO_2C_{1-6}$алкил, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$алкил), $-N(C_{1-6}$алкил)$_2$, -NH(фенил), $-N(фенил)_2$, -CN, $-NO_2$, -галоген, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SCF_3$, $-CHF_2$, $-OCHF_2$, $-SCHF_2$, -фенил, -Офенил, -C(O)фенил, $-C(O)C_{1-6}$алкил. Примеры подходящих заместителей включают без ограничения метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор-бутил, трет-бутил, винил, метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, метилтио, этилтио, пропилтио, изопропилтио, бутилтио, гидрокси, гидроксиметил, гидроксиэтил, гидроксипропил, гидроксибутил, фтор, хлор, бром, йод, циано, нитро, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, трифторметил, трифторметокси, трифторметилтио, дифторметил, дифторметокси, дифторметилтио, морфолино, амино, метиламино, диметиламино, фенил, фенокси, фенилкарбонил, бензил и ацетил.

Соединения по настоящему изобретению могут быть в форме фармацевтически приемлемых солей. Следует иметь в виду, однако, что любые соли за исключением фармацевтически приемлемых, также попадают в объем настоящего изобретения, так как они могут быть полезными в качестве промежуточных соединений при получении фармацевтически приемлемых солей или могут быть полезными при хранении или транспортировке. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли фармацевтически приемлемых неорганических кислот, таких как соляной,

серной, фосфорной, азотной, угольной, борной, сульфаминовой и бромистоводородной кислот, или соли фармацевтически приемлемых органических кислот, таких как уксусной, пропионовой, масляной, винной, малеиновой, гидроксималеиновой, фумаровой, малеиновой, лимонной, молочной, слизевой, глюконовой, бензойной, янтарной, щавелевой, фенилуксусной, метансульфоновой, толуолсульфоновой, бензолсульфоновой, салициловой сульфаниловой, аспарагиновой, глутаминовой, этилендиаминтетрауксусной, стеариновой, пальмитиновой, олеиновой, лауриновой, пантотеновой, дубильной, аскорбиновой и валериановой кислот.

Основные соли включают без ограничения соли, образованные с фармацевтически приемлемыми катионами, такими как натрий, калий, литий, кальций, магний, аммоний и алкиламмоний.

Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы такими средствами, как низший алкилгалогенид, таким как метил, этил, пропил и бутил хлориды, бромиды и иодиды; диалкилсульфаты как диметиловый и диэтилсульфат; и другими.

Также следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут обладать асимметрическими центрами и поэтому могут существовать более чем в одной стереоизомерной форме. Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединениям в практически чистой изомерной форме с одним или несколькими асимметрическими центрами, например, больше чем приблизительно 90% эи, например, приблизительно 95% или 97% эи или выше 99% эи, а также смесей, включая их рацемические смеси. Такие изомеры могут быть получены выделением из природных источников путем асимметрического синтеза, например с применением хиральных промежуточных соединений или хирального разрешения. Соединения по настоящему изобретению могут существовать в виде геометрических изомеров. Настоящее изобретение также относится к соединениям в практически чистых *cis* (Z) или *trans* (E) формах или их смесей.

Соединения по настоящему изобретению могут быть получены путем выделения из растения или части растения, или путем дериватизации выделенного соединения, или путем дериватизации связанного соединения.

Применяемое в данном документе выражение "рана" относится к физическому нарушению непрерывности или целостности структуры ткани. Раны включают те, которые могут быть острыми или хроническими и включают порезы и рваные раны, хирургические разрезы или раны, проколы, потертости, царапины, раны, вызванные сжатием, ссадины, раны, вызванные трением, язвы от лежачего положения (например, пролежни); раны от теплового воздействия (ожоги от источников холода и тепла), раны от химического воздействия (например, кислотные или щелочные ожоги) или патогенные инфекции (например, вирусная, бактериальная или грибковая), включая открытые или интактные нарывы, кожные высыпания, пятна и прыщи, язвы, хронические раны (включая раны, связанные с сахарным диабетом, такие как язвы голени и стопы, язвы на ногах при венозной недостаточности и пролежни), участки доноров и получателей кожного трансплантата/трансплантации, состояния, связанные с иммунным ответом, например, псориаз и экзема, язвы желудка или кишечника, раны ротовой полости, включая язвы полости рта, поврежденные хрящи или кости, раны после ампутации и повреждения роговицы.

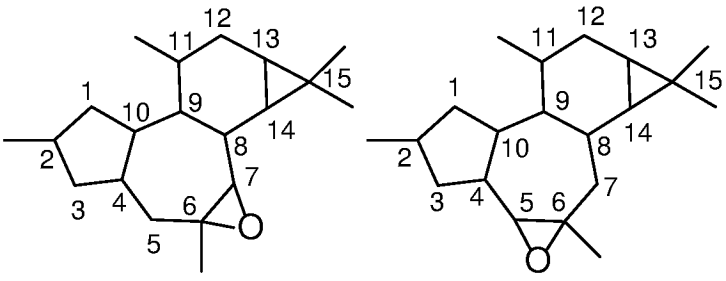
Применяемое в данном документе выражение "хроническая рана" относится к ране, которая не зажила в пределах нормального периода времени, необходимого для заживления в случае здорового субъекта. Хронические раны могут быть те, которые не заживают из-за состояния здоровья субъекта, например, у субъекта с нарушением кровообращения или с заболеванием, таким как диабет, или когда объект принимает лекарственный препарат, который ингибирует нормальный процесс заживления. Заживление может быть нарушено в присутствии инфекции, такой как бактериальная, грибковая или паразитарная инфекция. В некоторых случаях хроническая рана может оставаться незаживающей неделями, месяцами или даже годами. Примеры хронических ран включают без ограничения диабетические язвы, пролежни и тропические язвы.

Выражение "содействие заживлению раны", применяемое в данном документе, относится к улучшению заживления раны по сравнению с заживлением раны, которое можно наблюдать у раны, которую не подвергали лечению. Содействие заживлению раны включает увеличение скорости заживления раны, например, рана может заживать при скорости на часы, дни или недели быстрее, чем при условии, когда рану не подвергали лечению. Содействие заживлению раны также может включать уменьшение рубцовой ткани в процессе заживления или в заживленной ране по сравнению с ожидаемым результатом, когда рану не подвергали лечению.

Выражение "заживление раны" относится к восстановлению целостности ткани, частично или в полном объеме.

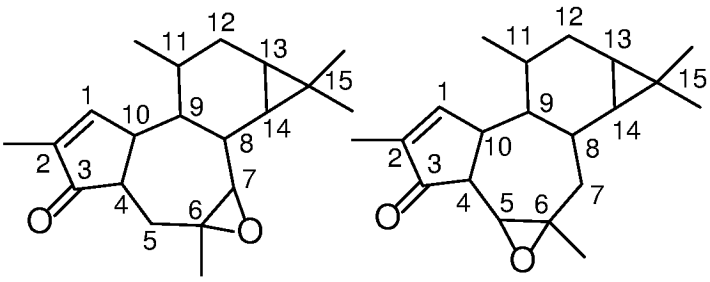
Выражение "уменьшение рубцевания" или "уменьшение рубцовой ткани" в контексте данного документа относится к улучшенному косметическому результату и/или уменьшенной патологической ткани, связанное с заживлением раны по сравнению с результатом, когда рану не подвергали лечению. В некоторых вариантах осуществления уменьшение рубцовой ткани включает уменьшение или минимизацию патологической ткани, уменьшение или минимизацию изменений в пигментации кожи и/или улучшение роста волос по сравнению с результатом, когда рану не подвергали лечению.

Выражение "соединения эпокси-тиглиана" относится к соединению, содержащему одну из следующих основных циклических структур углерода:



Соединения содержат трицикло[9.3.0.0]тетрадекан систему с конденсированным кольцом циклопропана, присоединенного к шестичленному кольцу. Эпоксид конденсирован с семи-членным кольцом в 5,6- или 6,7-положении.

Выражение "соединение эпокси-тиглиаен-3-он" относится к соединению, содержащему структуру эпокси-тиглиана, определенную выше, где пяти-членное кольцо содержит структуру 1,2-ен-3-он:



Способы заживления раны

В первом аспекте по настоящему изобретению предложен способ содействия заживлению раны у субъекта, включающий введение субъекту соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли.

Рана, которую необходимо лечить, может присутствовать в любом органе или ткани, включая внутренние органы или ткани, или внешние ткани, такие как кожа. Рана может быть результатом травмы, укуса или ожога. Органом или тканью может быть любой один или несколько из кожи, мышц, печени, почек, легких, сердца, поджелудочной железы, селезенки, желудка, кишечника, мочевого пузыря, яичников, яичек, матки, хряща, сухожилия, связки, кости и тому подобное. В конкретных вариантах осуществления рана представляет собой кожу и/или мышцы.

В некоторых вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана вводят сразу после возникновения раны. В других вариантах осуществления рана представляет собой хроническую рану, которая не смогла зажить на протяжении дней, недель, месяцев или лет. В ещё других вариантах осуществления рана представляет собой существующую рану, которая не смогла зажить с

нормальной скоростью или которую не удалось вылечить с помощью других видов терапии.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять к ране, которая заживает или зажила с чрезмерным рубцеванием. Примерами таких ран являются те, которые приводят или привели к образованию келоидных рубцов или гипертрофических рубцов.

В некоторых вариантах осуществления рана инфицирована бактериальной инфекцией. Бактериальная инфекция может быть вызвана грамположительными или грамотрицательными бактериями, главным образом грамположительными бактериями. Не ограничивающие примеры бактерий, на которые оказывают воздействие соединения по настоящему изобретению, включают бактерии рода *Bacillus*, такие как *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. firmis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. pantothenticus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. circubins*, *B. laterosporus*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*; Staphlococcus, такие как *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*; Streptococcus, например, *S. pyrogenes*, *S. pneumoniae*, *S. alagactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. anginosus*, *S. salwarius*, *S. milleri*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. uberus* и *S. avium*; *Aerococcus spp.*, *Gemella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Listeria spp.*, *Kurthia spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Arachnia spp.*, *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Rothia spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.* и *Mycobacterium spp.*

В некоторых вариантах осуществления рана инфицирована грибковой инфекцией. Грибковая инфекция может быть вызвана нитчатыми грибами или дрожжами. Не ограничивающие примеры грибов, на которые оказывают воздействие соединения по настоящему изобретению, включают грибы рода, например, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Trichtophyton* spp., *Cladosporium* spp.,

Ulocladium spp., *Curvularia* spp., *Aureobasidium* spp., *Candida albicans*, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Malessezia pachydermatis*, *Malessezia* spp. и *Trichosporon* spp.

В некоторых вариантах осуществления рана инфицирована как бактериальной, так и грибковой инфекцией, включая биопленки.

Субъект с раной, требующей лечения, может быть любым субъектом, включая млекопитающих, птиц, рыб и рептилий. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек, животное-компаньон, лабораторное животное, животное, выращиваемое на ферме или используемое для работ, выращиваемая на ферме птица, животное для скачек или дикое животное в неволе, например, содержащееся в зоопарках. Примеры подходящих субъектов включают, но без ограничения, людей, собак, кошек, кроликов, хомяков, морских свинок, мышей, крыс, лошадей, крупный рогатый скот, овец, коз, оленей, свиней, обезьян, сумчатых, кур, гусей, канареек, волнистых попугайчиков крокодилов, ящериц, змей и тому подобное. В конкретных вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, такое как человек, собака, кошка, лошадь, крупный рогатый скот, овца, коза, свинья, олень, крыса, морская свинка, кенгуру, кролик или мышь.

В некоторых вариантах осуществления введение соединения эпокси-тиглиана содействует заживлению раны путем увеличения скорости заживления раны. В некоторых вариантах осуществления введение соединения эпокси-тиглиана содействует заживлению за счет уменьшения рубцевания или количества рубцовой ткани, которые образуются при отсутствии лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение улучшает косметический результат, или исход, или внешний вид раны после заживления, включая улучшение пигментации кожи и улучшение роста волос по сравнению с раной, которую не подвергали лечению.

В конкретных вариантах осуществления по содействию заживлению раны терапия предпочтительно представляет собой местное введение, или вокруг

места, или введение в очаг поражения для обеспечения локализованного воздействия.

Выражение "эффективное количество" означает количество, необходимое для достижения желаемого эффекта по меньшей мере частично, например, для инициирования заживления раны или увеличения скорости заживления раны. Количество варьирует в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению, состава композиции, оценки медицинской ситуации и других соответствующих факторов. Предполагается, что количество будет снижаться в относительно широком диапазоне, что может быть определено с помощью обычных испытаний. Эффективное количество по отношению к пациенту-человеку, например, может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 нг на 1 кг массы тела до 1 г на 1 кг массы тела на дозу. Доза предпочтительно находится в диапазоне от1мкг до 1 г на 1 кг массы тела на дозу, например, находится в диапазоне от 0,5 мг до 1 г на 1 кг массы тела на дозу. В одном варианте осуществления доза находится в диапазоне от 1 мг до 500 мг на дозу. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне от 1 мг до 250 мг на дозу. В еще одном варианте осуществления доза находится в диапазоне от 1 до 100 мг на дозу, например, до 50 мг на дозу. В еще одном варианте осуществления доза находится в диапазоне от 1 мкг до 1 мг на 1 кг массы тела на дозу. Схемы приема можно отрегулировать для обеспечения оптимального терапевтического эффекта. Например, несколько разделенных доз можно вводить ежедневно, еженедельно, ежемесячно или в другие подходящие промежутки времени, или доза может быть пропорционально снижена, если такое показано потребностью по ситуации.

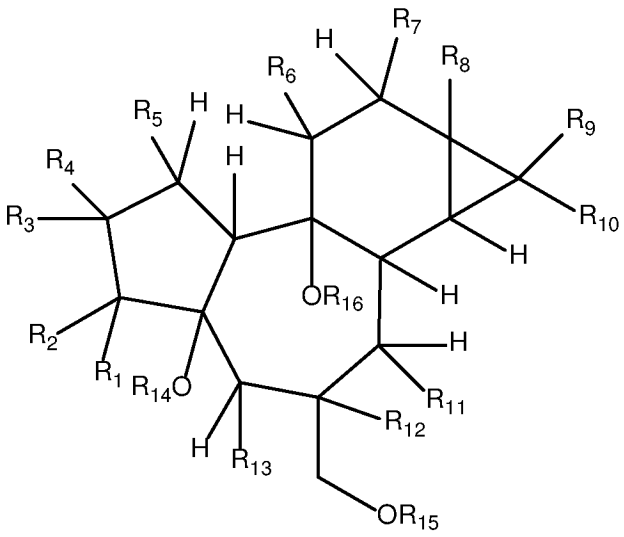
В некоторых вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана или растительный экстракт, содержащий, по меньшей мере одно соединение эпокси-тиглиана, можно вводить по отдельности, либо одновременно либо последовательно, или в той же композиции, как и другое фармацевтически активное средство, которое применяют для заживления раны. Например,

соединения эпокси-тиглиана можно вводить в комбинации с антибиотиком и/или противовоспалительным средством. Подходящие антибиотики включают бета-лактамные антибиотики, такие как пенициллин, ампициллин, амоксициллин, флуклоксациллин, диклоксациллин, метациллин, карбенициллин и нороциллин; цефалоспорины, такие как цефалексин, цефацетрил, цефадроксил, цефалоглицин, цефалониум, цефалоридин, цефатризин, цеаклор, цефпроксил, цефузонам, цефметазол, лоракарбеф, цефминокс, цефдинир, цефподоксим и цефпиром; карбапенемы, такие как имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем, панипенем и биапенем; аминогликозиды, такие как гентамицин, стрептомицин, неомицин, канамицин, ванкомицин, эритромицин и азитромицин; оксазолидиноны, такие как линезолид и позизолид; линкозамиды, такие как клиндамицин; хинолины, такие как оксолиновая кислота, ципрофлоксацин, эноксацин, офлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин и дифлоксацин; и сульфонамиды, такие как сульфаметоксазол, сульфадиазин и сульфацетамид, или смеси, такие как амоксиклав (амоксициллин и клавулановая кислота). Подходящие противовоспалительные средства включают нестероидные противовоспалительные препараты, такие как мелоксикам, пироксикам, оксикам, аспирин, дифунизал, ибупрофен дексибупрофен, напроксен, кетопрофен, индометацин, толметин мефенамовая кислота, нимесулид и т.п.; и кортикостероиды, такие как гидрокортизон, преднизолон, метилпреднизолон, преднизон, будесонид, бетаметазон и дексаметазон.

Соединения эпокси-тиглиана можно применять в комбинации с другими видами терапии для заживления раны, такими как повязки и мази, лосьоны и гели. Например, соединения эпокси-тиглиана можно применять в комбинации с повязками, содержащими серебро, и повязками, мазями, лосьонами и гелями, содержащими терапевтические средства, такие как йод, алоэ вера, папайя или медицински активные виды меда, такие как мед манука, или другие биологически или физиологически активные средства, такие как противовирусные средства, антибактериальные средства, противогрибковые средства и витамины, такие как A, C, D и E и их сложные эфиры. Соединения эпокси-тиглиана также можно применять в комбинации с повязками, которые

обеспечивают молекулярную структуру раны. Такие повязки могут включать полимерные пленки и сшитые полимерные пленки, такие как гиалуроновая кислота и родственные структуры, включая гиалуроновую кислоту загущенную сшитым полимером.

В некоторых вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана представляет собой соединение формулы (I):



(I)

где

R_1 представляет собой водород, и R_2 представляет собой -OR_{17}; или R_1 и R_2 вместе образуют карбонильную группу (=O);

R_3 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R_4 и R_5 независимо представляют собой водород или –OR_{17}; или R_4 и R_5 вместе образуют двойную связь или эпоксид (-O-);

R_6 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R_7 представляет собой -OH или -OR_{18};

R_8 представляет собой -OH или –OR_{18}; при условии, что R_7 и R_8 одновременно не являются -OH;

R_9 и R_{10} независимо выбраны из водорода и C_{1-6}алкила;

R_{11} и R_{12} или R_{12} и R_{13} вместе образуют эпоксид, а оставшаяся группа R_{11} и R_{13} представляет собой водород, -OH или $–OR_{17}$;

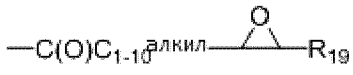
R_{14} представляет собой водород или $–R_{17}$;

R_{15} представляет собой водород или $-R_{17}$;

R_{16} представляет собой водород или $–R_{17}$;

R_{17} представляет собой водород, -C_{1-6}алкил, -C_{2-6}алкенил, -C_{2-6}алкинил, -C(O)C_{1-6}алкил, -C(O)C_{2-6}алкенил или –C(O)C_{2-6}алкинил;

R_{18} представляет собой C_{1-20}алкил, -C_{2-20}алкенил, -C_{2-20}алкинил, -C(O)C_{1-20}алкил, -C(O)C_{2-20}алкенил, -C(O)C_{2-20}алкинил, -C(O)циклоалкил, -C(O)C_{1-10}алкилциклоалкил; -C(O)C_{2-10}алкенилциклоалкил, -C(O)C_{2-10}алкинилциклоалкил, -C(O)арил, -C(O)C_{1-10}алкиларил, -C(O)C_{2-10}алкениларил, -C(O)C_{2-10}алкиниларил, -C(O)C_{1-10}алкилC(O)R_{19}, -C(O)C_{2-10}алкенилC(O)R_{19}, -C(O)C_{2-10}алкинилC(O)R_{19}, -C(O)C_{1-10}алкилCH(OR_{19})(OR_{19}), -C(O)C_{2-10}алкенилCH(OR_{19})(OR_{19}), -C(O)C_{2-10}алкинилCH(OR_{19})(OR_{19}), -C(O)C_{1-10}алкилSR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкенилSR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкинилSR_{19}, -C(O)C_{1-10}алкилC(O)OR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкенилC(O)OR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкинилC(O)OR_{19}, -C(O)C_{1-10}алкилC(O)SR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкенилC(O)SR_{19}, -C(O)C_{2-10}алкинилC(O)SR_{19},



,

или

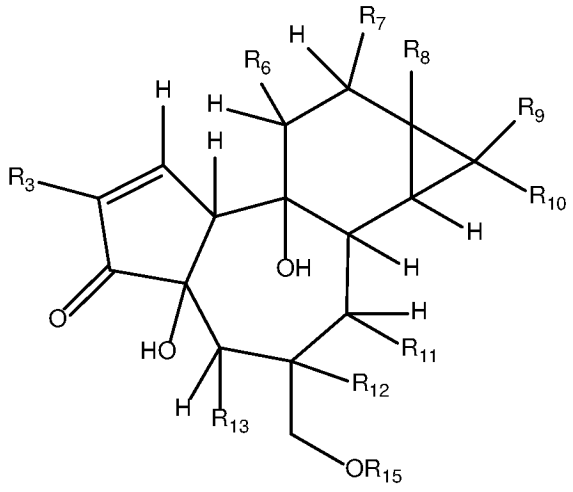
;

и

R_{19} представляет собой водород, -C_{1-10}алкил, -C_{2-10}алкенил, -C_{2-10}алкинил, циклоалкил или арил;

где каждая алкильная, алкенильная, алкинильная, циклоалкильная или арильная группа необязательно замещена; или его геометрический изомер, или стереоизомер, или его фармацевтически приемлемую соль.

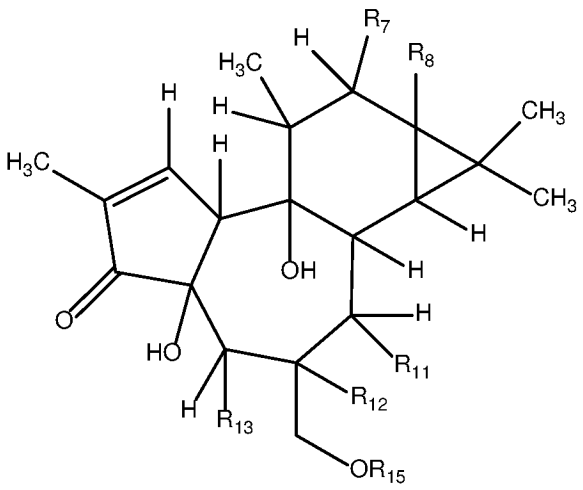
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение эпокси-тиглиаен-3-он формулы (II):



(II)

где R_3, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13} и R_{15} такие, как определено для формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или (II) представляет собой соединение формулы (III):



где R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, R_{13} и R_{15} определены для формулы (I).

В конкретных вариантах осуществления формулы (I), формулы (II) или формулы (III) применяют одно или несколько из следующих условий:

R_1 представляет собой водород и R_2 представляет собой OH или –OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или -OC(O)C_{2-6}алкинил, или R_1 и R_2 вместе образуют карбонильную группу; предпочтительно, где R_1 и R_2 вместе образуют карбонильную группу;

R_3 представляет собой водород или -C_{1-3}алкил, предпочтительно –C_{1-3}алкил, более предпочтительно метил;

R_4 представляет собой водород или -OH, –OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил и

R_5 представляет собой водород или -OH, –OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил; или R_4 и R_5 вместе образуют двойную связь или эпоксид; предпочтительно, где R_4 и R_5 вместе образуют двойную связь;

R_6 представляет собой водород или -C_{1-3}алкил, предпочтительно –C_{1-3}алкил, более предпочтительно метил;

R_7 представляет собой –OH, -OC(O)C_{1-15}алкил, -OC(O)C_{2-15}алкенил, -OC(O)C_{2-15}алкинил, -OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена, -OC(O)C_{1-15}алкиларил, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)H, -OC(O)C_{2-10}алкенилC(O)H, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-10}алкенилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{1-10}алкилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{2-10}алкенилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{1-10}алкилSC_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-10}алкенилSC_{1-6}алкил, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)OC_{1-6}алкил или -OC(O)C_{2-10}алкилC(O)OC_{1-6}алкил; предпочтительно –OH, -OC(O)C_{1-15}алкил, -OC(O)C_{2-12}алкенил, -OC(O)C_{2-12}алкинил, -OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена, -OC(O)C_{1-12}алкиларил, -OC(O)C_{1-6}алкилC(O)H, -OC(O)C_{2-6}алкенилC(O)H, -OC(O)C_{1-6}алкилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{1-6}алкилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{2-6}алкенилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{1-6}алкилSC_{1-3}алкил, -OC(O)C_{2-}

$_6$алкенилSC_{1-3}алкил, -OC(O)C_{1-6}алкилC(O)OC_{1-3}алкил или -OC(O)C_{2-6}алкилC(O)OC_{1-3}алкил;

R_8 представляет собой –OC(O)C_{1-15}алкил, -OC(O)C_{2-15}алкенил, -OC(O)C_{2-15}алкинил или –OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена, предпочтительно -OC(O)C_{1-10}алкил, -OC(O)C_{2-10}алкенил, -OC(O)C_{2-10}алкинил или –OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена; более предпочтительно -OC(O)C_{1-10}алкил, -C(O)C_{2-10}алкенил и -OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена;

R_9 и R_{10} независимо представляют собой -C_{1-3}алкил, предпочтительно, где R_9 и R_{10} оба представляют собой метил;

R_{11} и R_{12} вместе образуют эпоксид, и R_{13} представляет собой -OH, -OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил, предпочтительно –OH или –C(O)C_{1-3}алкил; или

R_{12} и R_{13} вместе образуют эпоксид, и R_{11} представляет собой -OH, -OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил, предпочтительно -OH; и

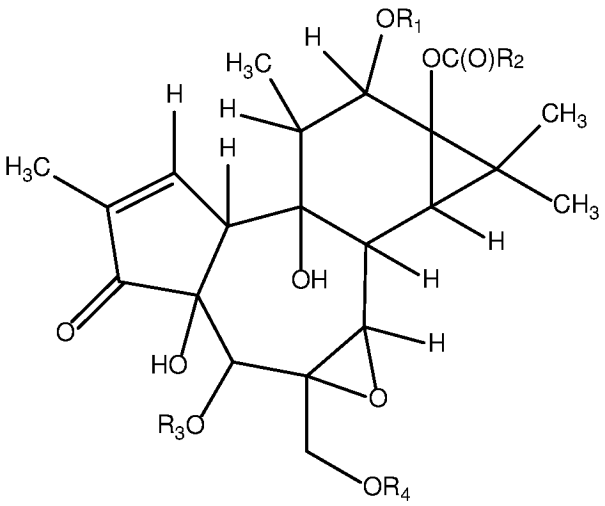
R_{14} представляет собой водород, -C(O)C_{1-6}алкил, -C(O)C_{2-6}алкенил или –C(O)C_{2-6}алкинил, предпочтительно водород;

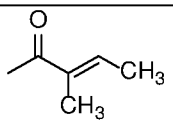
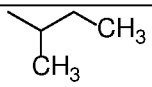
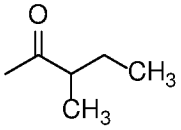
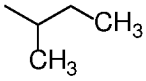
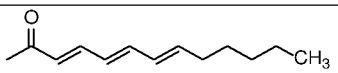
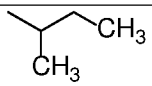
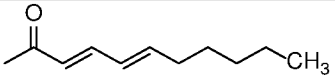
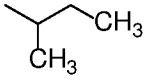
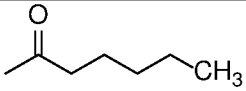
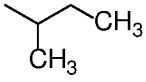
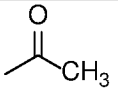
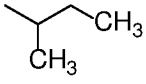
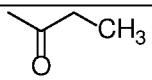
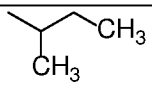
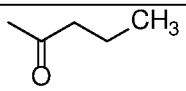
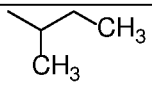
R_{15} представляет собой водород, -C(O)C_{1-6}алкил, -C(O)C_{2-6}алкенил или –C(O)C_{2-6}алкинил, предпочтительно водород или –C(O)C_{1-3}алкил; и

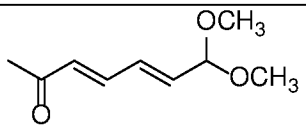
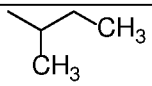
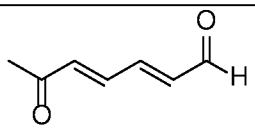
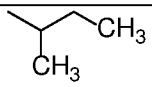
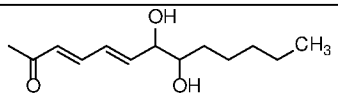
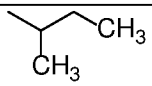
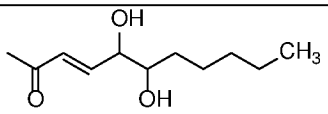
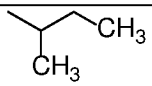
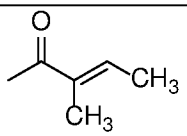
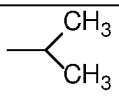
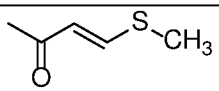
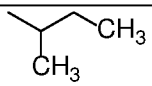
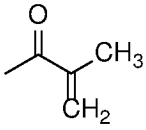
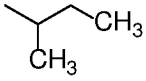
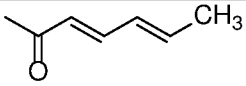
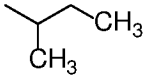
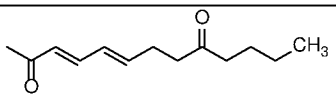
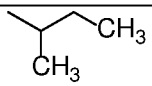
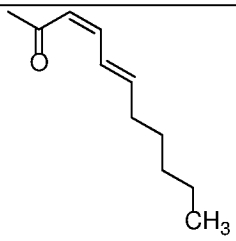
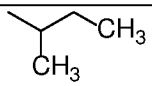
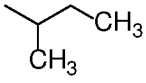
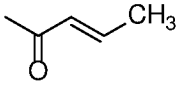
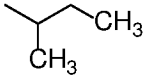
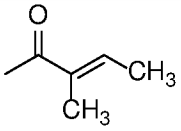
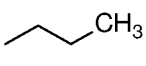
R_{16} представляет собой водород, -C(O)C_{1-6}алкил, -C(O)C_{2-6}алкенил или –C(O)C_{2-6}алкинил, предпочтительно водород.

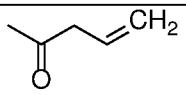
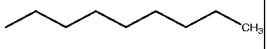
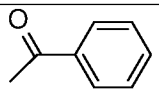
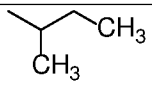
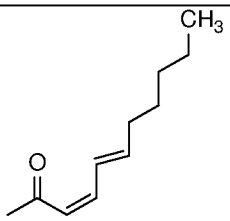
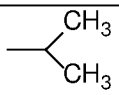
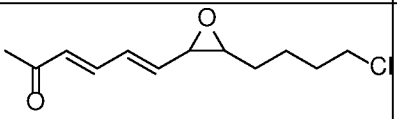
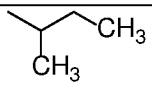
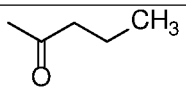
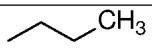
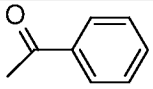
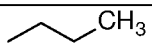
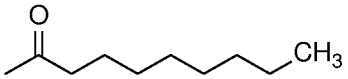
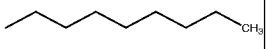
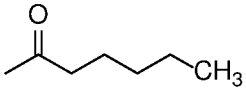
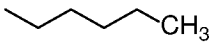
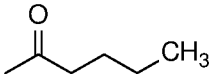
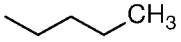
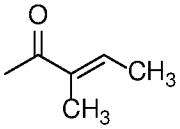
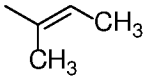
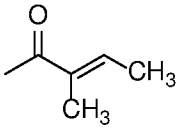
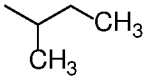
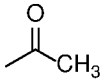
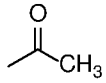
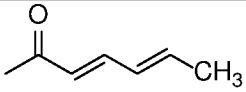
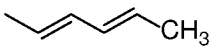
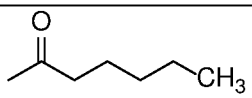
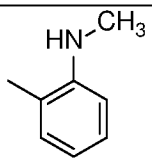
В конкретных вариантах осуществления соединение эпокси-тиглиана выбрано из одного из следующих соединений в таблицах 1-6:

Таблица 1



Соединение	R_1	R_2	R_3	R_4
1			H	H
2			H	H
3			H	H
4			H	H
5			H	H
6			H	H
7			H	H
8			H	H

9			H	H
10			H	H
11			H	H
12			H	H
13			H	H
14			H	H
15			H	H
16			H	H
17			H	H
18			H	H
19			H	H
20			H	H
21			H	H

22			H	H
23			H	H
25			H	H
26			H	H
27			H	H
28			H	H
41			H	H
42			H	H
43			H	H
44			H	H
45				
46			H	H
47			H	H

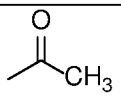
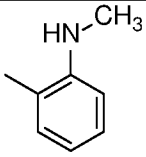
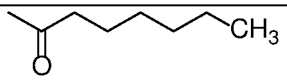
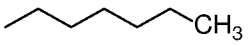
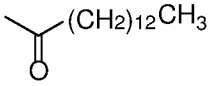
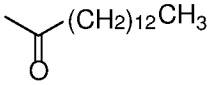
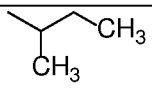
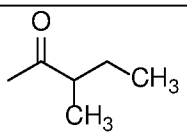
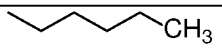
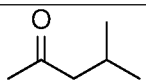
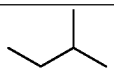
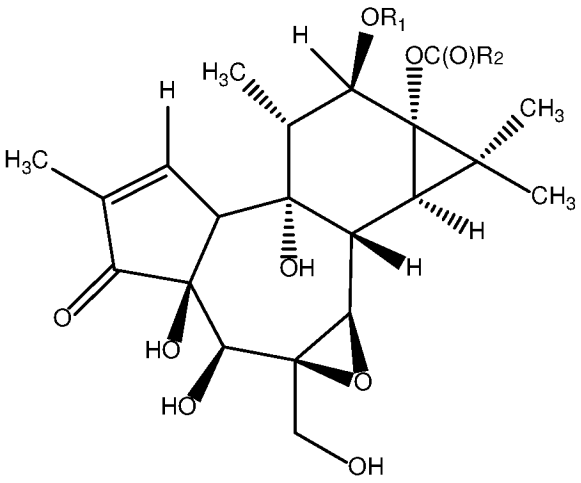
48			H	H
49			H	H
50		-CH_3	H	H
51			H	H
52		-CH_3	H	H
53	-OH		H	H
60			H	H

Таблица 2



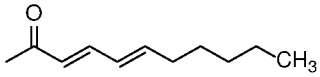
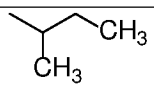
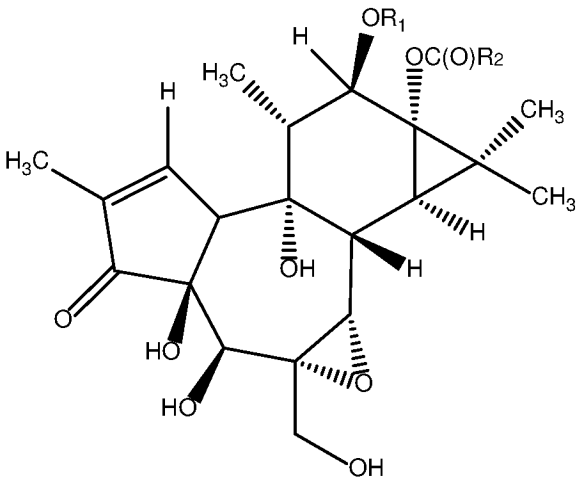
Соединение	R_1	R_2
24		

Таблица 3



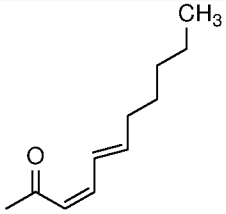
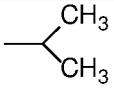
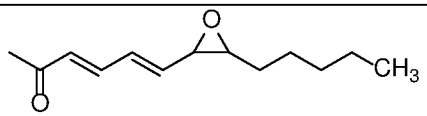
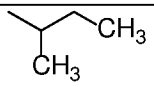
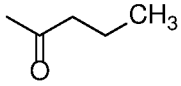
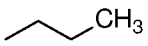
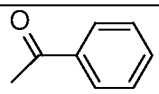
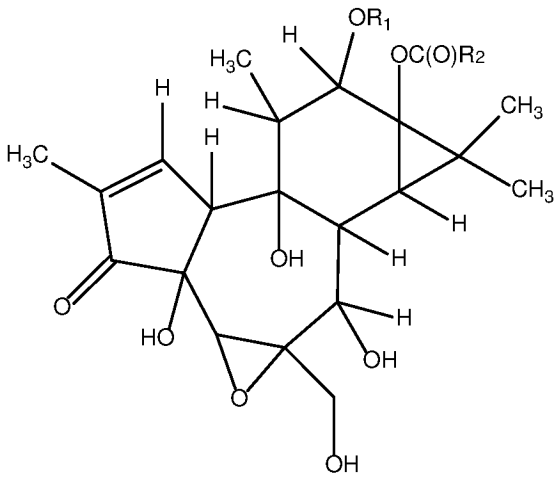
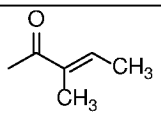
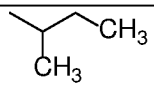
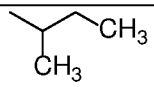
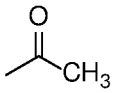
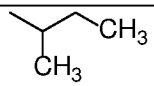
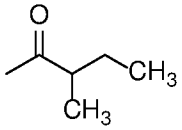
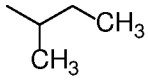
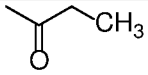
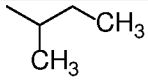
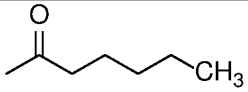
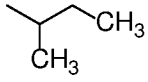
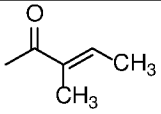
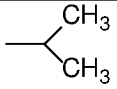
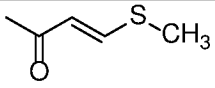
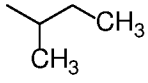
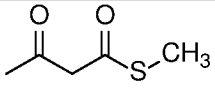
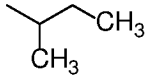
Соединение	R_1	R_2
54		
55		
56		
57		

Таблица 4



Соединение	R_1	R_2
29		
30	-H	
31		
32		
33		
34		
35		
36		
39		

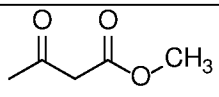
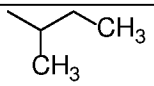
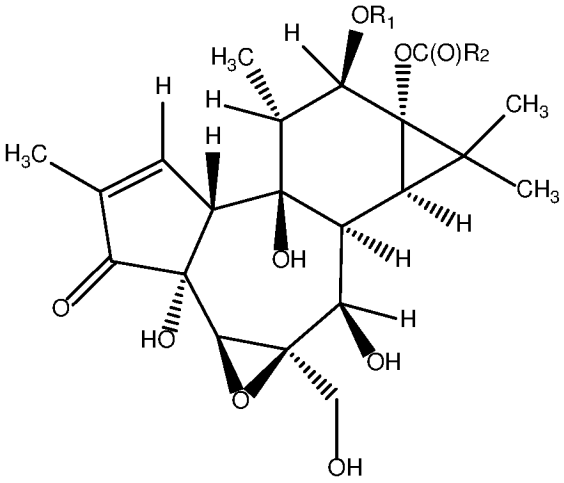
40		

Таблица 5



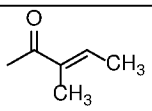
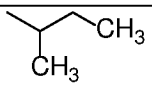
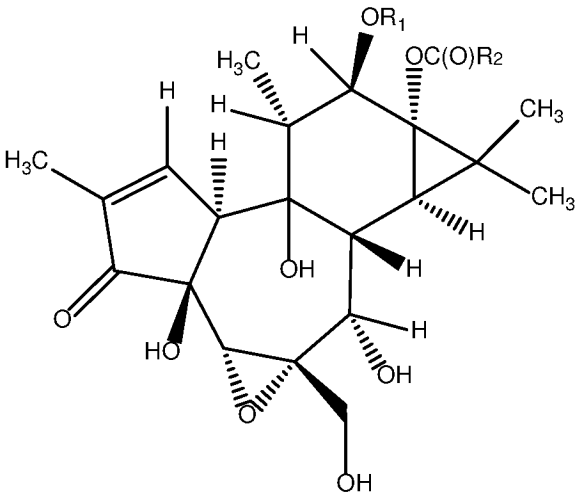
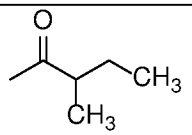
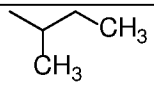
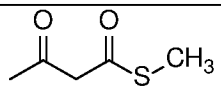
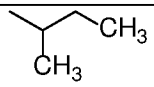
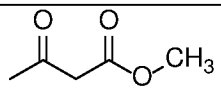
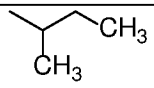
Соединение	R_1	R_2
37		

Таблица 6



Соединение	R_1	R_2

38		
58		
59		

Соединения по настоящему изобретению могут быть в форме чистого соединения или в форме растительного экстракта.

Если соединения изображены как имеющие стереохимию, изображенная стереохимия представляет собой относительную стереохимию и базируется на знании пути биосинтеза и химического анализа.

В некоторых вариантах осуществления растительный экстракт получен из растения рода *Fontainea* или *Hylandia*, предпочтительно рода *Fontainea pancheri, Fontainea australis, Fontainea borealis, Fontainea fugax, Fontainea oraria, Fontainea picrosperma, Fontainea rostrata, Fontainea subpapuana, Fontainea venosa* или *Hylandia dockrillii*, предпочтительно *Fontainea picrosperma*, *Fontainea australis*, *Fontainea rostrata* или *Hylandia dockrillii*.

Части растения могут включать плод, семя, кору, стебель, лист, цветок, корни, эндосперм, внеплодник и древесина, предпочтительно, когда экстракт получают из семени.

Экстракты растений можно получать с помощью стандартных способов, например, биомасса, полученная из семян, листьев, плодов, эндосперма, внеплодника, стебля или коры растения является объектом первичной экстракции растворителем, таким как полярный растворитель, например, этанол. Первичный экстракт затем концентрируют и разбавляют водой, и подвергают экстракции вторым растворителем, например, этилацетатом. Образцы растворителя из второго экстракта объединяют и производят разделение путем

фракционирования с помощью препаративной HPLC. Фракции анализируют с помощью аналитической HPLC и объединяют в соответствии с временем удерживания соединений, найденных в образцах. Объединенные фракции взвешивают, подвергают биологическому исследованию и анализируют с помощью аналитической HPLC. Далее выполняют фракционирование с применением одной или нескольких препаративных HPLC для выделения конкретных соединений. Каждое соединение подвергают биологическому исследованию и идентифицируют его структуру с помощью УФ, ЯМР и масс-спектрометрических методов.

Другие соединения по настоящему изобретению можно получить путем дериватизации соединений, выделенных из растений или частей растений, особенно из рода *Fontainea*, предпочтительно из вида *Fontainea picrosperma*, предпочтительно семян *Fontainea picrosperma*.

Производные природных соединений можно получать с применением способов, известных из уровня техники. Например, гидроксильные группы могут быть окислены до кетонов, альдегидов или карбоновых кислот под воздействием окислителей, таких как хромовая кислота, реактив Джонса, $KMnO_4$, перкислоты, например, mCPBA (метахлорпербензойная кислота) или диоксираны, например, диметилдиоксиран (DMDO) и метил(трифторметил)диоксиран (TFDO). Окислители могут быть выбраны таким образом, чтобы другие функциональные группы в молекуле также подвергались или не подвергались окислению. Например, первичный спирт может быть выборочно окислен до альдегида или карбоновой кислоты в присутствии вторичных спиртов с применением реагентов, таких как $RuCl_2(PPh_3)_3$-бензол. Вторичные спирты могут быть выборочно окислены до кетонов в присутствии первичного спирта с применением Cl_2-пиридина или $NaBrO_3$-церий-аммоний нитрата. Спирты могут быть окислены в присутствии двойных и тройных связей и без эпимеризации на соседних стереоцентрах с применением реактива Джонса с или без целита (или хлорида аммония). Кроме того, выбранные реактивы могут быть менее селективными в окислении к более чем к одной функциональной группе.

Гидроксильные группы также могут быть дериватизированы путем этерификации или ацилирования. Например, простые эфиры могут быть получены путем образования алкоксид-иона в присутствии основания и взаимодействия алкоксида с соответствующим алкилгалогенидом, алкенилгалогенидом, алкинилгалогенидом или арилгалогенидом. Аналогично, ацилирование может быть осуществлено путем образования алкоксид-иона и взаимодействия с соответствующей карбоновой кислотой или активированной карбоновой кислотой (например, ангидридом или ацилхлоридом).

Ацильные группы могут быть гидролизованы с образованием спиртов в результате кислотного или щелочного гидролиза, известного в данной области техники, и полученные спирты могут быть дериватизированы дополнительно, как описано выше.

Кетоны могут быть восстановлены до вторичных спиртов с помощью восстановителей, таких как литийалюминийгидрид и других гидридов металлов без восстановления двойных связей, включая α-ненасыщенные кетоны.

Двойные связи и тройные связи могут быть восстановлены в одинарные связи с применением каталитического восстановления, например, H_2/Pd. Двойные связи также могут быть окислены с образованием эпоксидов с применением окислителей, таких как перкислоты, например, mCPBA или диоксираны, например, DMDO и TFDO. Двойные связи также могут быть задействованы в реакции присоединения для введения заместителей, таких как галогенов, гидроксигрупп или алкоксигрупп.

Специалист в данной области техники сможет определить подходящие условия для получения производных выделенных соединений, например, путем ссылки на тексты, относящиеся к методологии синтеза, примерами которых являются Smith M.B. и March J., March's Advanced Organic Chemistry, Fifth Edition, John Wiley & Sons Inc., 2001 и Larock R.C., Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Ltd., 1989. Кроме того, селективные манипуляции функциональных групп могут потребовать защиты других функциональных

групп. Подходящие защитные группы для предотвращения нежелательных побочных реакций приведены в Green и Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons Inc., 3rd Edition, 1999.

Соединения изобретения

В другом аспекте настоящего изобретения представлены новые соединения, включающие:

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 5);

12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 6);

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 7);

12-бутаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 8);

12-[(2*E*,4*E*)-(6,6-диметоксигекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 9);

12-[(2*E*,4*E*)-6-оксогекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 10);

12-[(2*E*,4E)-6,7-дигидроксидодека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 11);

12-[(2*E*)-4,5-дигидрокси-дека-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 12);

12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 13);

12-[(2*E*)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 14);

12-(2-метилпроп-2-еноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 15);

12-[(2*E*,4*E*)-гекс-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 16);

12-[(2*E*,4*E*)-8-оксododека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 17);

12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 18);

13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 19);

12-[(2*E*)-бут-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 20);

12-тиглоил-13-бутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 21);

12-(3-бутеноил)-13-нонаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 22);

12-бензоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 23);

12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 25);

12-[(2*E*,4*E*)-6,7-(анти)-эпокси-додека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 26);

12,13-дибутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 27);

12-бензоил-13-бутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 28);

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 29);

13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 30);

12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 31);

12,13-ди-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 32);

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 33);

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 34);

12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 35);

12-[(2*E*,4E)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 36);

12-{[2-(метилсульфанил)карбонил]-ацетоил}-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 39);

12-[(2-метоксикарбонил)-ацетоил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 40);

12,13-ди-ноноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 41);

12,13-ди-гексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 42);

12,13-ди-пентаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 43);

12,13-ди-тиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 44);

5,20-диацетил-12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 45);

12,13-ди-(2*E*,4*E*)-гекс-2,4-еноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 46);

12-гексаноил-13-[2-(N-метилантранилоил)]-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 47);

12-ацетил-13-[2-(N-метилантранилоил)]-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 48);

12,13-ди-гептаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 49);

12-миристоил-13-ацетил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 50);

12-миристоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 51);

12-(2-метилбутаноил)-13-ацетил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 52) и

13-гексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 53);

12,13-ди-(3-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 60)

или их фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном аспекте настоящего изобретения любое из соединений 5-53 или 60, или их фармацевтически приемлемая соль могут быть в форме фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем.

Композиции

В то время как соединения эпокси-тиглиана или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить в не смешанном виде, более удобно вводить соединения эпокси-тиглиана в виде фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем.

Лекарственную форму и пропорции для фармацевтического применения и композиций может легко определить специалист в данной области техники.

Лекарственные формы включают таблетки, дисперсии, суспензии, инъекции, растворы, сиропы, пастилки, капсулы, суппозитории, аэрозоли, трансдермальные пластыри, пропитанные (окклюзионные) повязки, кремы, гели и тому подобное. Эти лекарственные формы также могут включать устройства для инъекции или имплантации, разработанные специально или модифицированные для осуществления контролируемого высвобождения фармацевтической композиции. Контролируемое высвобождение терапевтического средства может быть осуществлено путем нанесения покрытия, например, гидрофобных полимеров, включая акриловые смолы, воски, высшие алифатические спирты, полимолочную и полигликолевую кислоты и некоторых производных целлюлозы, например,

гидроксипропилметилцеллюлозы. Кроме того, контролируемое высвобождение может быть осуществлено при применении других полимерных матриц, липосом и/или микросфер.

Фармацевтически приемлемые носители и приемлемые носители для системного введения также можно включать в композиции по настоящему изобретению.

Соответственно, фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель или приемлемый наполнитель. Выражение "фармацевтически приемлемый наполнитель" подразумевает твердый или жидкий наполнитель, разбавитель или инкапсулирующее вещество, которое можно безопасно применять. В зависимости от конкретного способа введения, можно применять различные носители, хорошо известные в данной области техники. Эти носители или наполнители могут быть выбраны из группы, включающей сахара, крахмал, целлюлозу и ее производные, солод, желатин или другие гелеобразующие средства, тальк, сульфат кальция, растительные масла, синтетические масла, спирты и/или полиолы, альгиновую кислоту, фосфатно-буферные растворы, эмульгаторы, изотонический физиологический раствор и апирогенную воду.

Любой подходящий путь введения можно применять для обеспечения человека или пациента, отличного от человека, фармацевтической композицией по настоящему изобретению. Например, можно применять пероральное, местное, ректальное, парентеральное, сублингвальное, буккальное, внутривенное, внутрисуставное, внутримышечное, внутри кожное, подкожное, ингаляционное, внутриглазное, внутрибрюшинное, интрацереброventрикулярное, трансдермальное введение и т.п.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как шприцы, флаконы, пробирки, капсулы, саше или таблетки, каждая из которых содержит определенное количество одного или нескольких фармацевтически активных соединений или экстрактов по настоящему изобретению в виде

порошка или гранул, или в виде раствора или суспензии в водном растворе, растворе циклодекстрина, в неводной жидкости, эмульсии масло-в-воде или эмульсии вода-в-масле, или в виде раствора или суспензии в виде крема или геля, или в виде суспензии микро- или наночастиц, содержащих соединение по настоящему изобретению, включая, без ограничений, диоксида кремния или полилактидные микро- или наночастицы. Такие композиции можно получать любым из способов в фармацевтической области, но все способы включают стадию ассоциации одного или нескольких фармацевтически активных соединений по настоящему изобретению с носителем, который состоит из одного или нескольких необходимых ингредиентов. Как правило, композиции получают путем равномерного и тщательного перемешивания средств по настоящему изобретению с жидкими носителями или мелко измельченными твердыми носителями, или обоими, а затем, если необходимо, придания продукту желаемой формы.

В порошках носитель представляет собой мелко измельченное твердое вещество, которое находится в смеси с мелко измельченным активным компонентом.

В таблетках активный компонент смешан с носителем, имеющим необходимую связывающую способность, в подходящих соотношениях и спрессован в желаемую форму желаемого размера.

Подходящие носители для порошков и таблеток включают карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, легкоплавкий воск, масло какао и тому подобное. Выражение "препарат" подразумевает как включающее состав активного соединения и инкапсулирующего вещества в качестве носителя, обеспечивающего получение капсулы, в которой активный компонент, с или без носителей, окружен носителем, который, таким образом, ассоциирован с ним. Аналогично, включены облатки и пастилки. Таблетки,

порошки, капсулы, пилюли, облатки и пастилки можно применять как твердые формы, подходящие для перорального введения.

Для приготовления суппозиториев легкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, сначала расплавляют и активный компонент гомогенно диспергируется в нем по мере того, как перемешивают. Расплавленную гомогенную смесь затем выливают в формы удобного размера, дают остыть и затвердеть.

Составы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде вагинальных суппозиториев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие подходящие носители, которые известны из уровня техники.

Препараты в виде жидких форм включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные или водно-пропиленгликолевые растворы. Например, для парентерального введения жидкие препараты можно приготовить в виде растворов в водном 1,2-пропандиоле, диметилсульфоксиде (DMSO), водном растворе гамма циклодекстрина или 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина, физиологическом растворе или полиэтилен-гликолевом растворе с или без буфера. Предпочтительный диапазон pH составляет 3,5-4,5. Подходящие буферы буферизуют препарат при pH 3,5-4,5 и включают, без ограничения, ацетатный буфер и цитратный буфер.

Соединения по настоящему изобретению, таким образом, могут быть составлены для парентерального введения (например, путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии) и могут быть представлены в форме единичной дозы в ампулах, предварительно наполненных шприцах, инфузии малого объема или в контейнерах с несколькими дозами с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, активный

ингредиент может быть в форме порошка, полученного выделением стерильного твердого вещества в асептических условиях или путем лиофилизации из раствора для смешивания перед применением с подходящим носителем, например, стерильной апирогенной водой.

Водные растворы, подходящие для перорального применения, можно получать путем растворения активного компонента в воде и добавления подходящих красителей, ароматизаторов, стабилизаторов и загустителей, по желанию.

Водные суспензии, подходящие для перорального применения, можно получать путем диспергирования мелко измельченного активного компонента в воде с вязким веществом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза или другими хорошо известными суспендирующими средствами.

Также включены препараты в твердой форме, которые предназначены для преобразования непосредственно перед применением в препараты в жидкой форме для перорального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать в дополнение к активному компоненту красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергирующие средства, загустители, солюбилизирующие средства и тому подобное.

Для местного введения в эпидермис или другой орган соединения по настоящему изобретению можно составлять в виде гелей, мазей, эмульсий, паст, кремов или лосьонов, или в виде трансдермального пластыря. Гели могут быть получены с применением подходящих загустителей и добавлением их в водные/спиртовые композиций соединения. Подходящие загустители или желирующие средства известны из уровня техники, например, поливинил-карбокси полимер, Carbomer 940. Мази и кремы, например, могут быть составлены на водной или масляной основе с добавлением подходящих загустителей и/или гелеобразующих средств. Лосьоны могут быть составлены на водной или масляной основе и обычно также содержат одно или несколько

эмульгирующих средств, стабилизирующих средств, диспергирующих средств, суспендирующих средств, загустителей или красителей.

Составы, подходящие для местного введения, также включают растворы или суспензии, которые можно вводить местно в форме ванны, или смачивающего раствора, или аэрозоля. Эти составы можно соответствующим образом применять для борьбы с раздражения кожи, укусами насекомых и ранами стопы.

Составы, подходящие для местного введения в полость рта, включают пастилки, содержащие активное средство в ароматизированной основе, обычно в сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в соответствующем жидком носителе.

Растворы или суспензии вводят непосредственно в носовую полость с помощью обычных средств, например с помощью капельницы, пипетки или спрея. Составы могут быть представлены в разовой дозе или в форме нескольких доз. В последнем случае при применении капельницы или пипетки можно достигнуть введения пациенту целесообразного, заранее определенного объема раствора или суспензии. В случае спрея это может быть достигнуто, например, с помощью дозирующей распыляющей помпы. Для улучшения назальной доставки и удерживания соединения по настоящему изобретению можно инкапсулировать с циклодекстринами или составить с их средствами, которые, как ожидается, улучшают доставку и удерживание на слизистой оболочке носа.

Введение в дыхательные пути также может быть достигнуто посредством аэрозольного состава, в котором активный ингредиент представлен в упаковке под давлением с подходящим пропеллентом, таким как, например, хлорфторуглерод (CFC), дихлордифторметан, трихлорфторметан или дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другим подходящим газом. Аэрозоль также может содержать поверхностно-активное вещество, такое как

лецитин. Дозу лекарственного препарата можно контролировать, обеспечив дозирующий клапан.

Альтернативно, активные ингредиенты могут быть представлены в форме сухого порошка, например порошковой смеси соединения в подходящей порошковой основе, такой как лактоза, крахмал, производные крахмала, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидон (PVP).

Обычно порошковый носитель образует гель в носовой полости. Порошковая композиция может быть представлена в форме разовой дозы, например в капсулах или картриджах из, например, желатина, или в блистерных упаковках, из которых порошок можно вводить с помощью ингалятора.

В составах, предназначенных для введения в дыхательные пути, включая интраназальные составы, соединение обычно будет иметь небольшой размер частиц, например порядка от 1 до 10 мкм или менее. Такой размер частиц может быть получен с помощью способов, известных из уровня техники, например, путем микронизации.

Настоящее изобретение будет описано со ссылкой на следующие примеры, которые иллюстрируют некоторые предпочтительные аспекты настоящего изобретения. Тем не менее, следует понимать, что особенностью следующего описания настоящего изобретения является не вытеснение общности предшествующего описания настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

На фигуре 1 представлено фотографическое изображение закрытия царапины в клетках неонатальных фибробластов человека, обработанных лишь носителем в качестве контроля, через 24 ч после возникновения царапины.

На фигуре 2 представлено фотографическое изображение закрытия царапины в клетках неонатальных фибробластов человека, обработанных 30 нг/мл соединения 1 через 24 ч после возникновения царапины.

На фигуре 3 представлено графическое изображение исследования инвазии в матригель клеток неонатальных фибробластов человека, обработанных 10 нг/мл или 30 нг/мл соединения 1 по сравнению с лишь носителем в качестве контроля. Клетки подсчитывали через 24 часа инкубации. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

На фигуре 4 представлен анализ вестерн-блот клеток неонатальных фибробластов человека, обработанных соединением 1 и показана активация и последующее снижение регуляции ключевых сигнальных молекул, участвующих в восстановлении раны и заживлении.

На фигуре 5 представлено фотографическое изображение влияния воздействия фибробластов (культивированных в присутствии TGF-β1) к диапазону концентраций соединения 1 на дифференциацию в миофибробласты, характеризующуюся повышенной экспрессией актина в α-гладких мышцах и формированием стресс-волокна.

На фигуре 6 представлено фотографическое изображение влияния воздействия фибробластов (культивированных в присутствии TGF-β1) к диапазону концентраций соединения 37 на дифференциацию в миофибробласты, характеризующуюся повышенной экспрессией актина в α-гладких мышцах и формированием стресс-волокна.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Растительные экстракты

Все растительные экстракты готовили путем измельчения растительного материала и извлечения этанолом в приблизительном соотношении 1 часть растительного материала к от 2 до 5 частей этанола (вес/вес). Экстракт выдерживали в течение ночи при 4°C и затем супернатант декантировали и хранили при 4°C до применения.

Присутствие соединений эпокси-тиглиана в растительных экстрактах подтверждали с помощью LCMSMS с применением HPLC Shimadzu,

соединенного с тройным квадрупольным масс-спектрометрометром ABI3200. Применяли колонку C18-галоген-амид для отделения соединений в смесях, используя смеси ацетонитрил/вода в качестве системы растворителей.

Большинство образцов хроматографировали с помощью способа KinC18Gen, применяя колонку C18, 4,6 мм x 100 мм, 2,6 мкм, C18 Kinetix:

Ацетонитрил:	55%	60%	75%	100%	100%	55%
Минуты:	0	2,5	15	15,1	17,5	17,6

Некоторые образцы хроматографировали с помощью способа Amide Long, применяя колонку Halo RP-амид, 4,6 мм x 150 мм, 2,7 мкм, от Advanced Materials Technology:

Ацетонитрил:	45%	58%	95%	95%	45%	45%
Минуты:	0	13	20	24	24,1	27

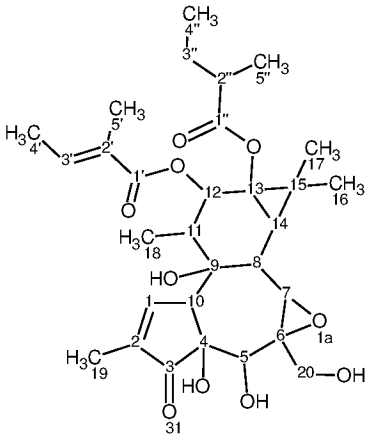
Пример 2. Выделение и идентификация соединений эпокси-тиглиана

Соединения из семян *Fontainea picrosperma* очищали экстракцией и хроматографией на силикагеле с последующей препаративной HPLC (колонка C18, в комбинации растворителей метанол/вода) с применением общих способов, описанных ниже.

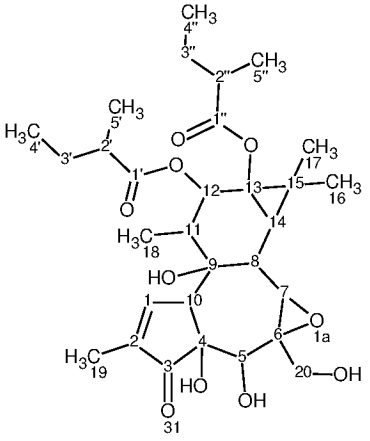
Примерно1-2 кг растительного материала (листья, плод, семя, стебли, корни, цветы, кора или древесина) мелко измельчали, экстрагировали с 2 частями этанола (вес/об.) три раза, экстракты объединяли, выпаривали и остаток разделяли между водным и несмешивающимся органическим растворителем (обычно нефтяной спирт т.п. 40-60 (PE) или этилацетат EtOAc). Остаток органического растворителя после выпаривания подвергали хроматографии на силикагеле в смеси растворителей по увеличению полярности, начиная с PE или гептана и продолжая в EtOAc, а затем метаноле. Фракции из силикагеля затем дополнительно очищали с помощью препаративной HPLC на колонках C18,

обычно с применением градиентов метанол-вода. Последние фракции анализировали на биологическую активность, объединяли в соответствии с временем удерживания соединений, обнаруженных с помощью аналитической HPLC, и подвергали дальнейшей препаративной HPLC с получением чистых соединений. Каждое соединение подвергали биологическому исследованию и подтверждали его структуру с помощью УФ, ЯМР и масс-спектрометрических методов.

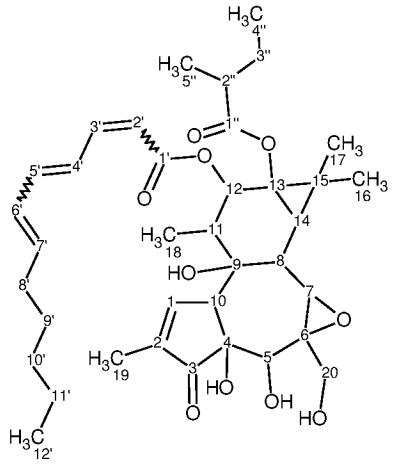
Соединение 1: 12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



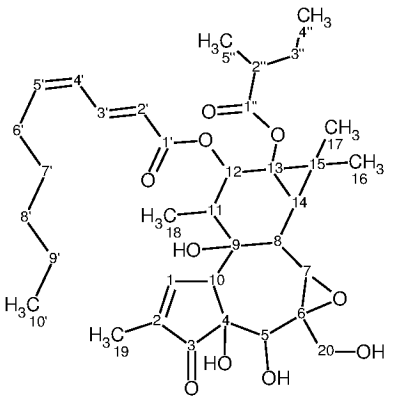
Соединение 2: 12,13-ди-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



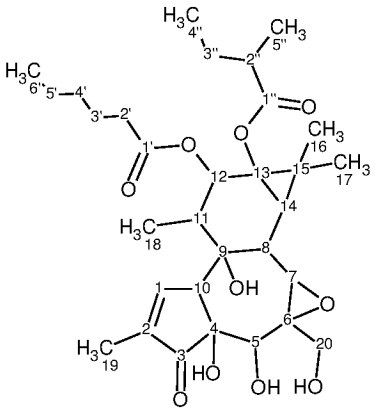
Соединение 3: 12-[(2*E*,4*E*,6*E*)-додека-2,4,6-триеноил] -13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



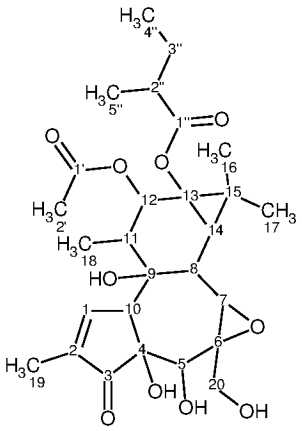
Соединение 4: 12-[(2*E*,4*Z*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



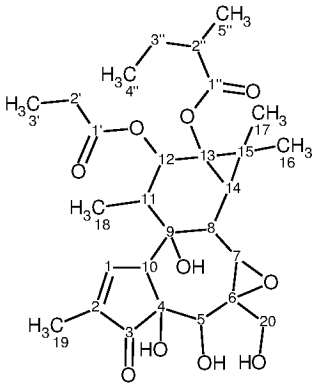
Соединение 5: 12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



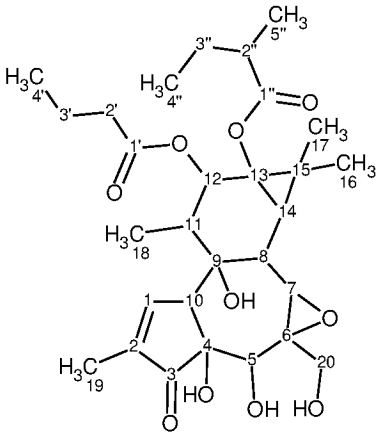
Соединение 6: 12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



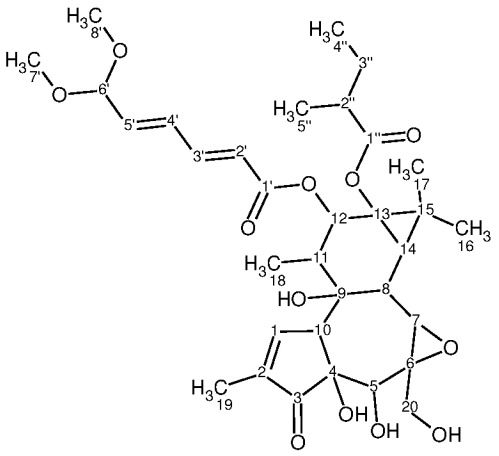
Соединение 7: 12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



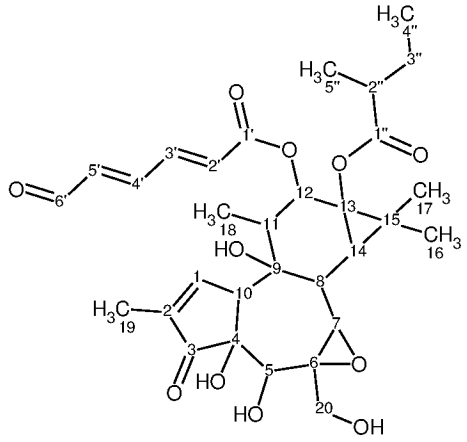
Соединение 8: 12-бутаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



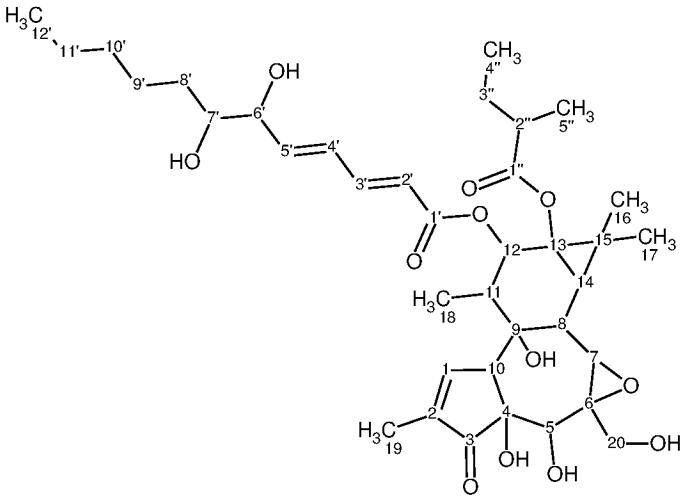
Соединение 9: 12-[(2*E*,4*E*)-(6,6-диметоксигекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



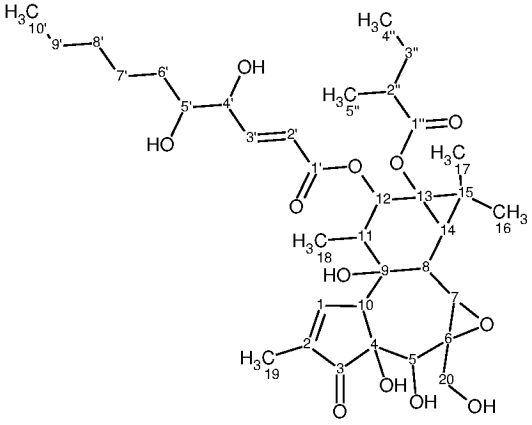
Соединение 10: 12-[(2*E*,4*E*)-6-оксогекс-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



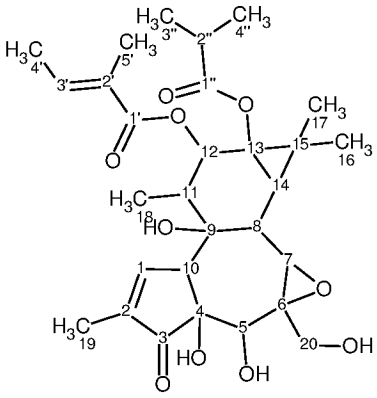
Соединение 11: 12-[(2*E*,4*E*)-6,7-дигидроксидодека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



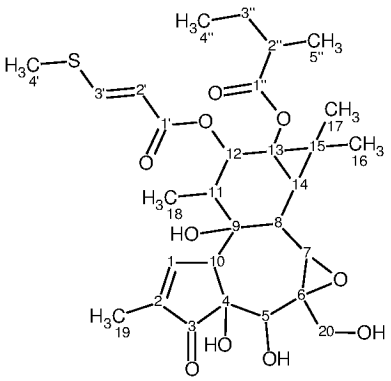
Соединение 12: 12-[(2*E*)-4,5-дигидрокси-дека-2,4-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



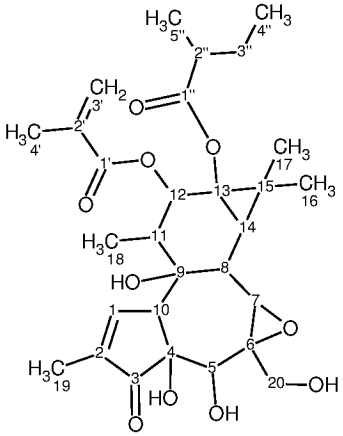
Соединение 13: 12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



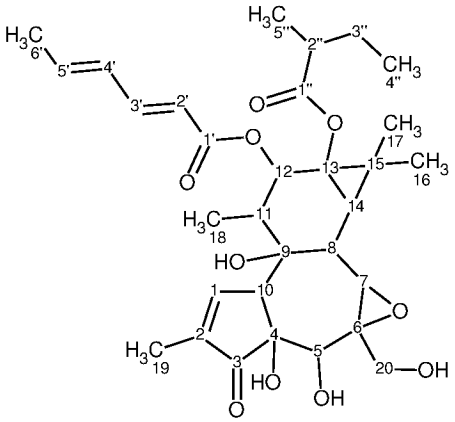
Соединение 14: 12-[(2*E*)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



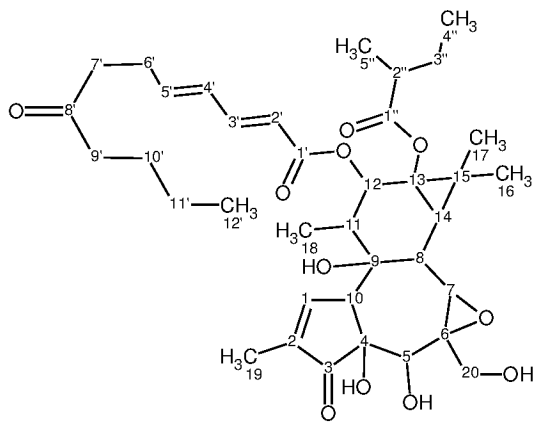
Соединение 15: 12- (2-метилпроп-2-еноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



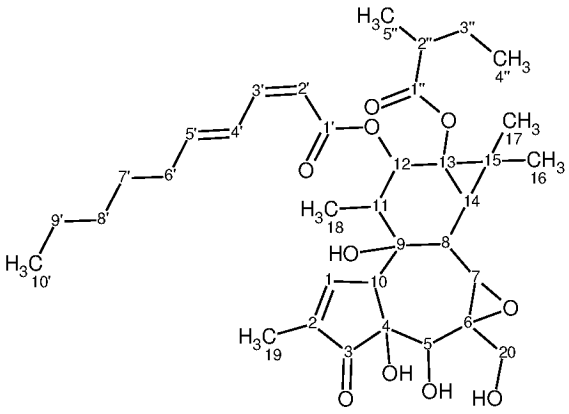
Соединение 16: 12-[(2*E*,4*E*)-гекс-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



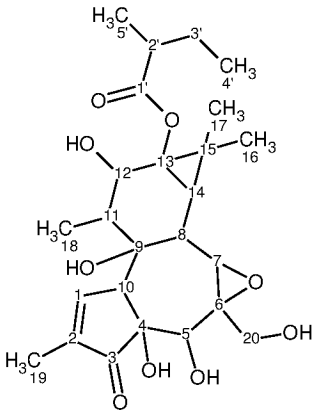
Соединение 17: 12-[(2*E*,4*E*)-8-оксододека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



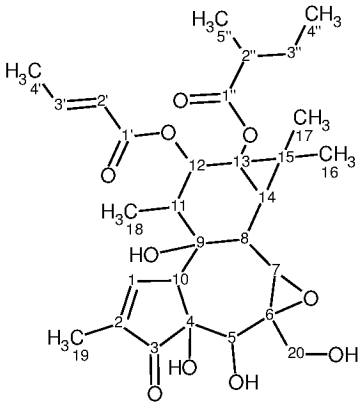
Соединение 18: 12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



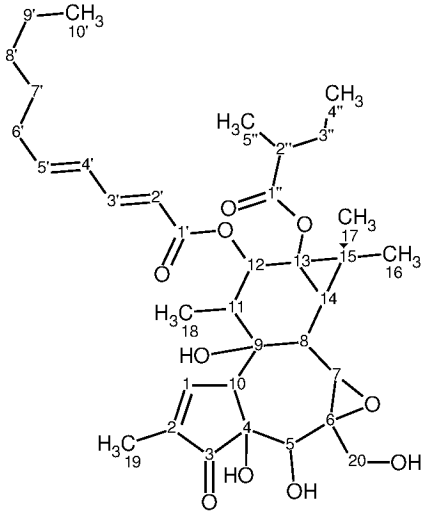
Соединение 19: 13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



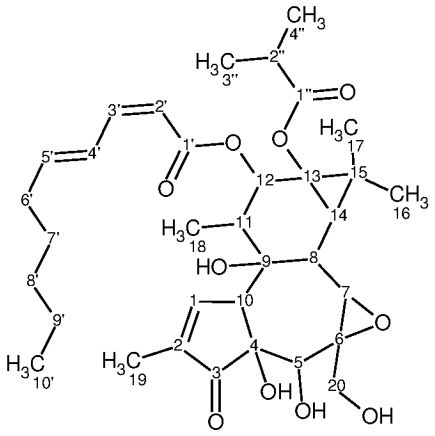
Соединение 20: 12-[(2*E*)-бут-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



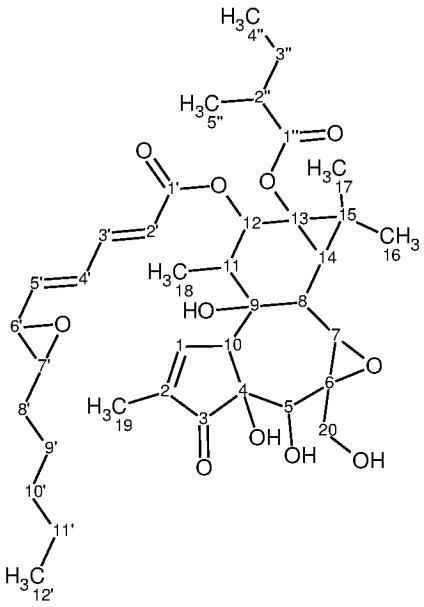
Соединение 24: 12-[(2*E*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



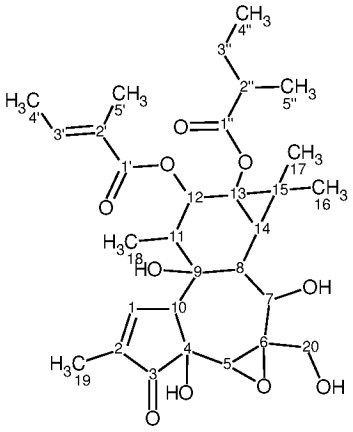
Соединение 25: 12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



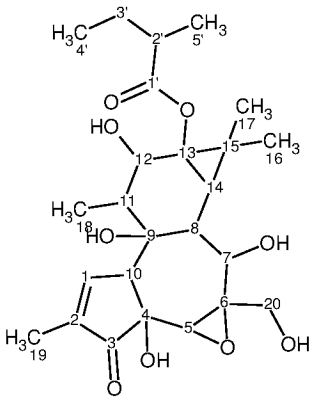
Соединение 26: 12-[(2*E*,4*E*)-6,7-(анти)-эпокси-додека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



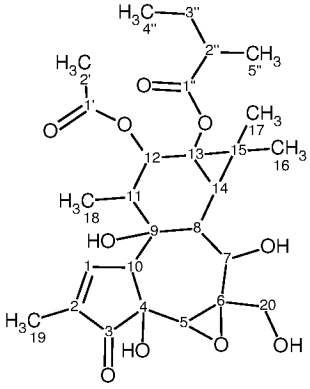
Соединение 29: 12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



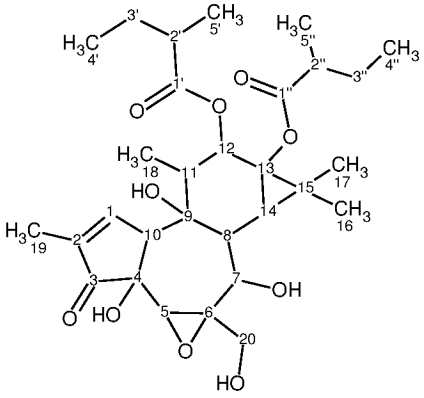
Соединение 30: 13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



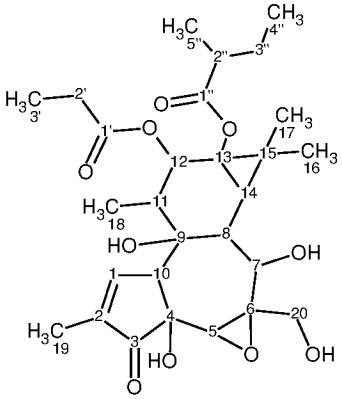
Соединение 31: 12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



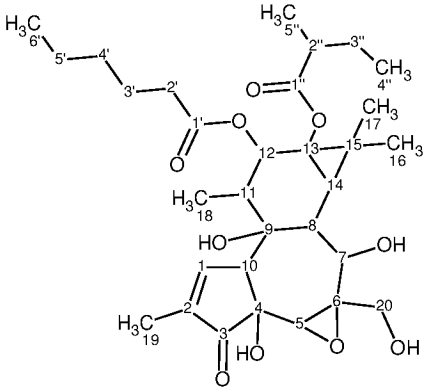
Соединение 32: 12,13-ди-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



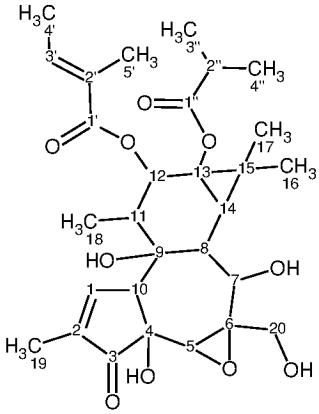
Соединение 33: 12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



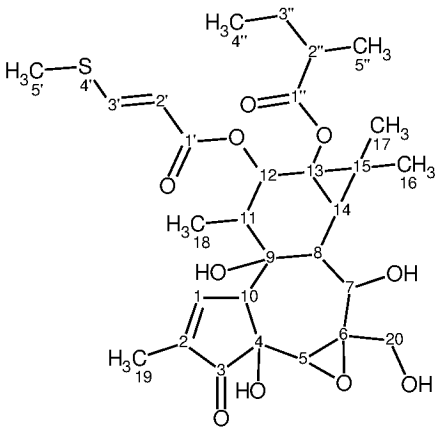
Соединение 34: 12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



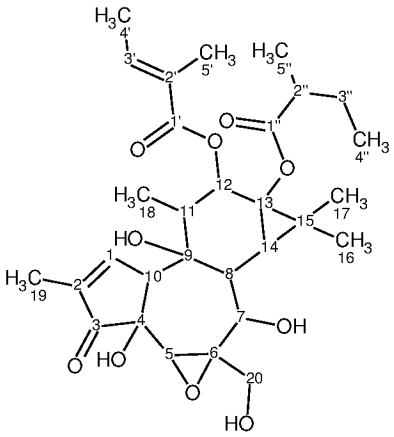
Соединение 35: 12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



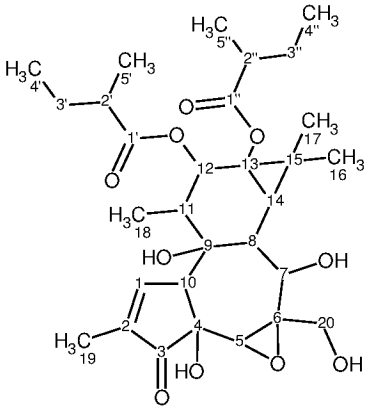
Соединение 36: 12-[(2*E*)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



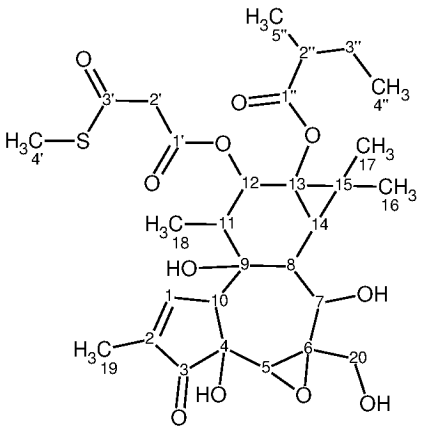
Соединение 37: 12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



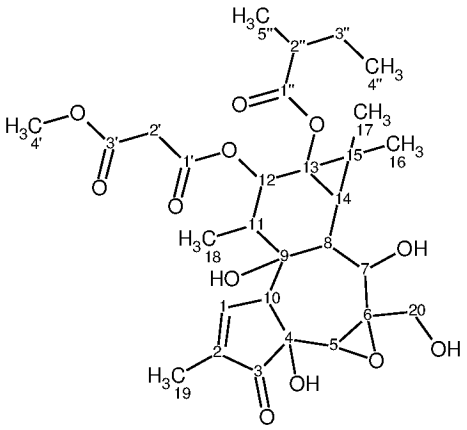
Соединение 38: 12,13-ди-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



Соединение 39: 12-{[2-(метилсульфанил)карбонил]-ацетоил}-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он



Соединение 40: 12-[(2-метоксикарбонил)-ацетоил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он

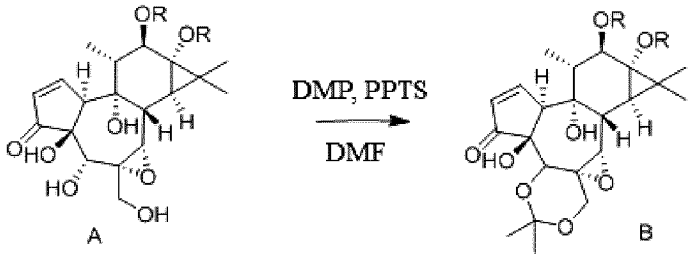


Пример 3. Получение производных тиглиана

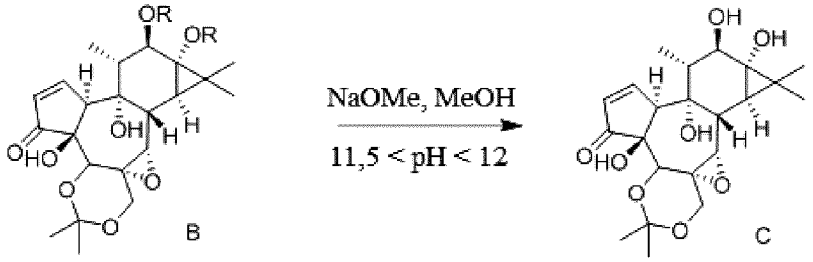
Ряд соединений получали полусинтетическим способом путем гидролиза С-12 и С-13 сложных эфиров смеси 5,20-ацетонидов соединений тиглиана, таких как соединение 1 и сродных соединений, а затем переэтерификации в С-12 и С-13 со стандартными реагентами с помощью следующих способов.

Неочищенную смесь сложных эфиров тиглиана для синтеза аналогов тиглиана готовили путем крупного измельчением 150 г семени *Fontainea picrosperma* и последующего экстрагирования путем перемешивания с ацетоном в колбе на 1 л. Через 4 часа эту суспензию отфильтровывали под вакуумом, а отфильтрованный осадок промывали ацетоном, пока TLC (PE: EtOAc: 4: 6) не показала отсутствие сложных эфиров тиглиана. Объединенные фильтраты выпаривали, получая неочищенную смесь сложных эфиров. Затем жиры удаляли с помощью хроматографии на короткой гравитационной колонке с силикагелем (нефтяной эфир/этилацетат; PE/EtOAc 8: 2→4: 6 в качестве элюента) с получением 8,2 г (5,5%) неочищенной смеси сложных эфиров.

Смесь сложных эфиров затем защищали, этерифицировали и повторно этерифицировали в положениях С-12 и С-13, как проиллюстрировано в следующих реакциях с применением различных ацильных групп с получением соединений 21, 22, 23, 27, 28, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 и 60.



10 мл раствора смеси A сложных эфиров в диметилформамиде (DMF) добавляли к 50 мл раствора пиридин-*p*-толуенсульфоната (PPTS, 4,1 г, в избытке) в DMF (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 минут. Затем добавляли 120 мл 2,2-диметоксипропана (DMP) и раствор перемешивали в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли раствором NaCl (150 мл) и промывали этилацетатом (EtOAc, 50 мл). Органическую фазу промывали раствором NaCl, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и упаривали. Остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 8:2→6:4 в качестве элюента) с получением 5,2 г (3,5%) смеси B сложных эфиров 5,20-ацетонида. Непрореагировавшее исходное вещество снова вступало в реакцию при те же самых условиях с получением дополнительной смеси B сложного эфира.



0,21 N раствор NaOMe готовили сразу после этого, медленно добавляя небольшие порции натрия (9,7 г) к метанолу при перемешивании (степень чистоты HPLC, 2 л). Затем при интенсивном перемешивании 128 мл этого раствора быстро добавляли к 6,4 г смеси B сложных эфиров 5,20-ацетонида. Значение pH полученного раствора поддерживали в диапазоне 11,5-12,0 путем разумного добавления 0,21 M NaOMe, обеспечивая не превышение pH 12,5. После перемешивания при комнатной температуре в течение 24 часов реакционную смесь нейтрализовали уксусной кислотой, фильтровали и

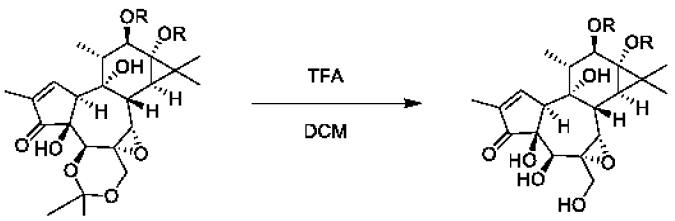
выпаривали до приблизительно 1/20 от исходного объема. Добавляли EtOAc (20 мл) и раствор промывали 2N H_2SO_4 (100 мл). Кислотное промывание обратно экстрагировали EtOAc и объединенные растворы EtOAc промывали раствором NaCl (2 x 300 мл). После сушки (Na_2SO_4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 6:4→4:6 в качестве элюента) с получением 1,4 г белого порошка.

Синтез аналогов тиглиана путем этерификации с получением симметричных соединений; иллюстративные способы этерификации Стеглиха с модификацией

1.

К раствору деацил-тиглиан ацетонида (100 мг; 0,23 ммоль) в THF (5 мл) добавляли 4-диметиламинопиридин (DMAP) (15 мг; 0,12 ммоль) и раствор нагревали до 60 °C (температура масляной бани). Отдельно к раствору этерифицирующей карбоновой кислоты (10 экв) в THF (10 мл/г) добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC, 10 экв); после перемешивания в течение приблизительно 15 минут суспензию фильтровали через ватный тампон и по каплям добавляли деацил-тиглиан ацетонид к раствору в THF. После перемешивания в течение 24 часов при 60°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (≈200 мл) и промывали 2*N* H2SO4 (≈50 мл), солевым раствором (2 x ≈50 мл) и далее насыщенным NaHCO3 (≈50 мл) и солевым раствором (2 x≈50 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→6:4 в качестве элюента) с получением 111 мг (80%) белого порошка.

3.2 Удаление защитной группы



СПОСОБ А (TFA в CH_2Cl_2)

Диэфир ацетонида (100 мг) добавляли к свежеприготовленному раствору трифторуксусной кислоты (TFA) в CH2Cl2 (2% об./об., 200 мкл, 2 мкл/мг). После перемешивания в течение 6-12 ч при комнатной температуре реакционную смесь обрабатывали промыванием смесью насыщенного NaHCO3 (≈10 мл) и солевого раствора (≈40 мл), и затем только солевым раствором (2x ≈40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 8:2→2:8 в качестве элюента) с получением аналогов тиглиана (выход приблизительно: 60-70%).

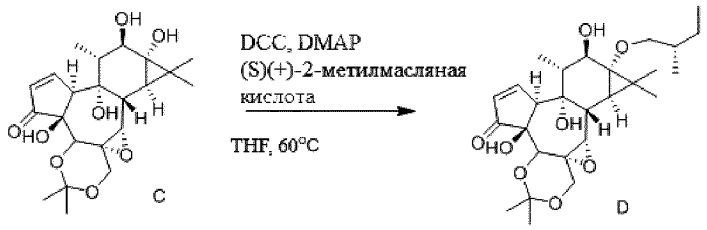
СПОСОБ В ($HClO_4$ в MeOH)

Диэфир ацетонида (100 мг) добавляли к свежеприготовленному раствору $HClO_4$ в MeOH [диапазоне pH: 1,5-2,0]. После перемешивания при комнатной температуре в течение 6-24 ч реакционную смесь обрабатывали путем нейтрализации ацетатом натрия, фильтровали и упаривали до приблизительно 1/20 от исходного объема. Затем добавляли EtOAc (10 мл) и раствор промывали 2*N* H_2SO_4 (30 мл), и затем солевым раствором (30 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 8:2→4:6 в качестве элюента) с получением диэфира с выходом приблизительно 60-70%.

Этот способ применяли для получения соединений 27, 41, 42, 43, 44, 46, 49 и 60.

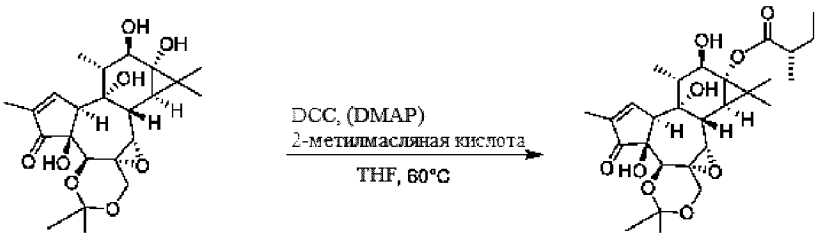
Синтез не симметричных диэфиров, иллюстративные способы:

1.



К раствору 12,13-деацил-5,20-ацетонида (C) (1,4 г; 3,4 ммоль) в 10 мл тетрагидрофурана (THF) добавляли 740 мл триэтиламина (ТЭА), 34 ммоль, и раствор нагревали до 60°C. Отдельно к раствору (S)-(+)-2-метилмасляной кислоты (3,702 мл; 34 ммоль) в THF (20 мл) добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC, 7015 г; 34 ммоль). После перемешивания в течение приблизительно 15 минут суспензию фильтровали и добавляли к нагретому раствору исходного диола (C). После перемешивания в течение 24 часов при 60°C, реакционную смесь разбавляли EtOAc (≈200 мл) и промывали 2N H_2SO_4 (≈50 мл), раствором NaCl (2 x ≈50 мл), и затем раствором $NaHCO_3$ (≈50 мл) и раствором NaCl (2 x≈50 мл). После сушки (Na_2SO_4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→6:4 в качестве элюента) с получением 12-деацил-5,20-ацетонид-13-[(*S*)-(+)-2-метилбутирата (D) в виде белого порошка.

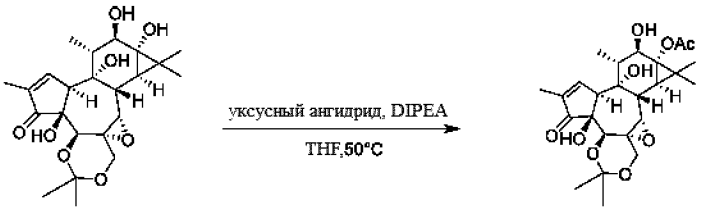
2.



К раствору 12,13-деацил-5,20-ацетонид C (100 мг; 0,25 ммоль) в THF (5 мл) добавляли (*S*)-(+)-2-метилмасляную кислоту (109 мкл; 1,00 ммоль) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC, 206,33 мг; 1,00 ммоль). Раствор перемешивали при 60°C (температура масляной бани) в течение 24 ч, а затем обрабатывали разбавлением EtOAc (≈20 mL) и промывали 2N H_2SO_4 (≈50 mL), солевым раствором (2 x ≈50 мл), насыщенным NaHCO3 (≈50 мл) и солевым раствором (2 x≈50 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания

остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→6:4 в качестве элюента) с получением 106,2 мг (60%) 12-деацил-5,20-ацетонид-13-((S)-2-метилбутирата) D в виде белого порошка.

3.



К раствору 12,13-деацил-5,20-ацетонид C (100 мг; 0,25 ммоль) в THF (5 мл) добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA) (131 мкл; 0,75 ммоль) и уксусный ангидрид (94 мкл; 0,75 ммоль). После перемешивания в течение 72 ч при комнатной температуре добавляли EtOAc (10 мл) и раствор промывали 2N H_2SO_4 (2 x 20 мл) и солевым раствором (20 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc - →4:6 в качестве элюента) с получением 12-деацил-13-ацетил-5,20-ацетонида, 104 мг (87%) в виде белого порошка.

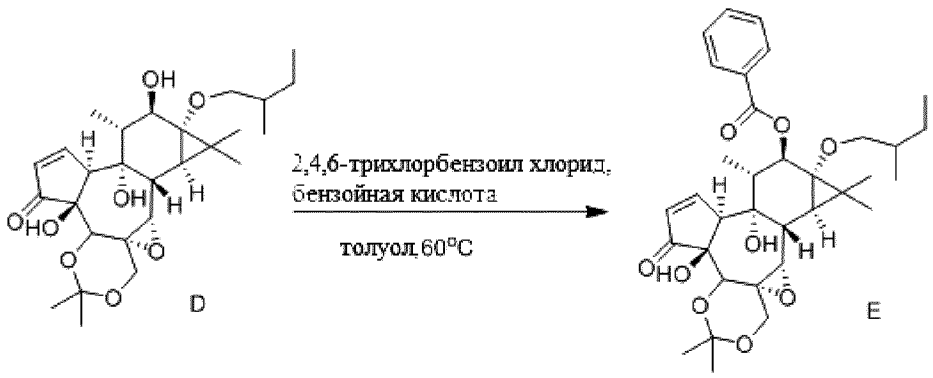
4.

К раствору деацил-5,20-ацетонида (100 мг; 0,25 ммоль) в толуоле (5 мл)/диметилформамиде (2 мл) добавляли N-метил-изатиновый ангидрид (266 мг; 1,50 ммоль) и диметиламинопиридин (DMAP) (31 мг; 0,25 ммоль). После перемешивания в течение 24 часов при 80°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (≈10 мл) и последовательно промывали [2*N* H2SO4 (≈20 мл)

+ солевой раствор (≈60 мл)](x2), и [насыщенный NaHCO3 (≈20 мл) + солевой раствор (≈60 мл)] (x2). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 12-деацил-13-[(N-метил)-антранилат-5,20-ацетонида, 114 мг (80%) в виде белого порошка.

Ацилирование 13-моноэфиров: иллюстративные способы

1.

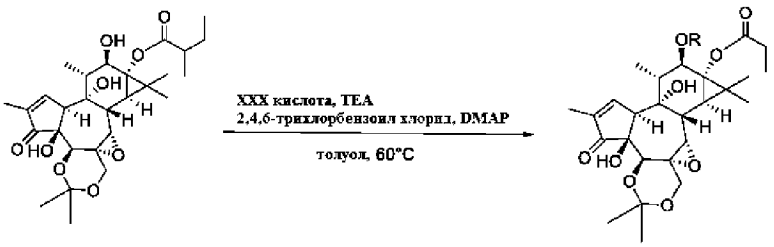


К раствору 12-деацил-5,20-ацетонид-13-[(S)-(+)-2-метилбутирата (D) (1062 мг; 2,04 ммоль) в толуоле (10 мл) добавляли диметиламинопиридин (DMAP) (249 мг, 2,04 ммоль). Отдельно к раствору бензойной кислоты (1224 мг, 10,02 ммоль) в толуоле (20 мл) добавляли триэтиламин (1,397 мл; 10,02 ммоль) и раствор перемешивали в течение приблизительно 2 минут до полного растворения; затем добавляли 2,4,6-трихлорбензоил хлорид (1,566 мл, 10,02 ммоль) (раствор 1). После перемешивания композиции, содержащей соединение D, в течение 6 часов суспензию фильтровали и выливали в раствор 1. После перемешивания в течение от 24 до 48 часов при 60°C, реакционную смесь разбавляли EtOAc (≈10 мл) и промывали раствором NH_2SO_4 (≈40 мл), раствором NaCl (2 x ≈40 мл), и затем раствором $NaHCO_3$ (≈40 мл) и раствором NaCl (2 x≈40 мл). После сушки (Na_2SO_4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 5,20-ацетонид-12-бензоат-13-[(S)-(+)-2-метилбутирата E в виде белого порошка.

2.

К раствору деацил-13-(*N*-метилантраноил)-5,20-ацетонида (100 мг; 0,18 ммоль) в тетрагидрофуране (THF, 5 мл) последовательно добавляли уксусный ангидрид (51 мг; 0,54 ммоль) и диметиламинопиридин (DMAP) (2,2 мг; 0018 ммоль). После перемешивания в течение 6 часов при 50°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (приблизительно ≈10 мл) и последовательно промывали 2N H_2SO_4 (2x приблизительно 40 мл), насыщенным NaHCO3 (2 x приблизительно 40 мл) и солевым раствором (2 x приблизительно 40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 95:05→7:3 в качестве элюента) с получением 12-ацетил-13-(N-метил)антранилат-5,20-ацетонида, 105 мг (95%) в виде белого порошка.

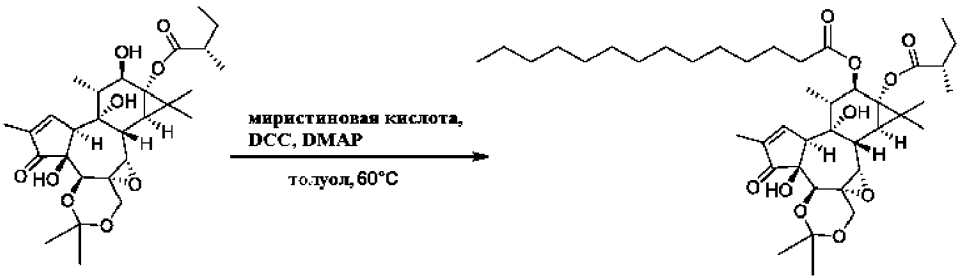
3.



К раствору 12-деацил-5,20-ацетонид-13-[(S)-2-метилбутирата] (100 мг; 0,19 ммоль) в толуоле (5 мл) добавляли диметиламинопиридин (DMAP) (23 мг, 0,19 ммоль). Отдельно к раствору тиглиновой кислоты (95 мг; 0,95 ммоль) в толуоле (5 мл) добавляли триэтиламин (132 мкл; 0,95 ммоль) и раствор перемешивали в течение приблизительно 2 мин до полного растворения; затем добавляли 2,4,6-трихлорбензоила хлорид (148 мкл; 0,95 ммоль) и после перемешивания в течение 6 ч при комнатной температуре суспензию фильтровали (ватный

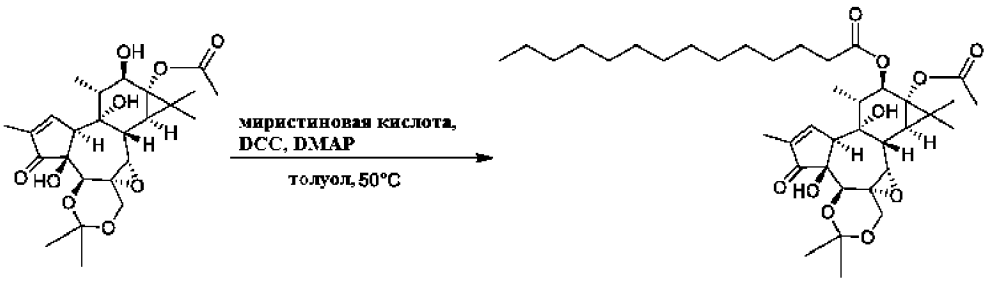
тампон) и добавляли по каплям к раствору моноэфира дитерпеноида в толуоле. После перемешивания в течение 24-48 ч при 60°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (приблизительно 10 мл) и промывали 2N H_2SO_4 (приблизительно 40 мл), солевым раствором (2 x ≈40 mL), и затем NaHCO3 (приблизительно 40 мл) и солевым раствором (2 x≈40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 12-тиглоил-13-метилбутирил-5,20-ацетонида, 59 мг (50%) в виде белого порошка.

4.



Раствор 12-деацил-5,20-ацетонид-13-(S)-2-метилбутирата (100 мг; 0,19 ммоль) в толуоле (10 мл) нагревали до 60°C и последовательно добавляли миристиновую кислоту (217 мг; 0,95 ммоль), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (196 мг; 0,95 ммоль) и диметиламинопиридин (DMAP) (23 мг; 0,19 ммоль). После перемешивания в течение 12 часов при 60°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (≈10 мл) и промывали 2N H_2SO_4 (2x 40 мл), насыщенным NaHCO3 (2x ≈40 мл) и солевым раствором (2x ≈40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 12-миристоил-13-(2-метилбутаноил)-5,20-ацетонида, 121 мг (70%) в виде белого порошка.

5.



Раствор 12-деацил-5,20-ацетонид-13-ацетата (100 мг; 0,25 ммоль) в толуоле (10 мл) нагревали до 60°C (температура масляной бани) и затем добавляли миристиновую кислоту (286 мг; 1,00 ммоль), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (206 мг; 1,00 ммоль) и диметиламинопиридин (DMAP) (31 мг; 0,25 ммоль). После перемешивания в течение 12 часов при 60°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (приблизительно ≈10 мл) и промывали 2*N* H_2SO_4 (2x приблизительно 40 мл), насыщенным NaHCO3 (2x приблизительно 40 мл) и солевым раствором (2 x приблизительно 40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 12-миристил-13-ацетил-5,20-ацетонида, 121 мг (70%) в виде белого порошка.

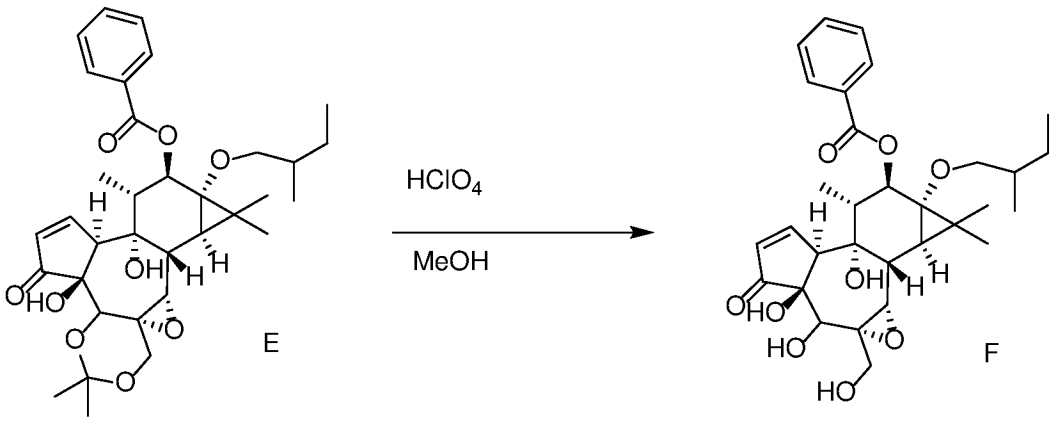
6.

К нагретому (60°C, температура масляной бани) раствору деацил-13-(*N*-метилантраноил)-5,20-ацетонида (100 мг; 0,18 ммоль) в толуоле (10 мл) последовательно добавляли гексановую кислоту (84 мг; 0,72 ммоль), дициклогексилкарбодиимид (DCC, 149 мг; 0,72 ммоль) и диметиламинопиридин (DMAP 22 мг; 0,18 ммоль). После перемешивания в течение 12 часов при 60°C реакционную смесь обрабатывали разбавлением EtOAc (приблизительно ≈10 мл) и последовательно промывали 2N H_2SO_4 (2x приблизительно 40 мл),

насыщенным NaHCO3 (2 х приблизительно 40 мл) и солевым раствором (2 х приблизительно 40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 9:1→7:3 в качестве элюента) с получением 12-гексаноил-13- (N-метилантраноил)-5,20-ацетонида, 108 мг (90%) в виде белого порошка.

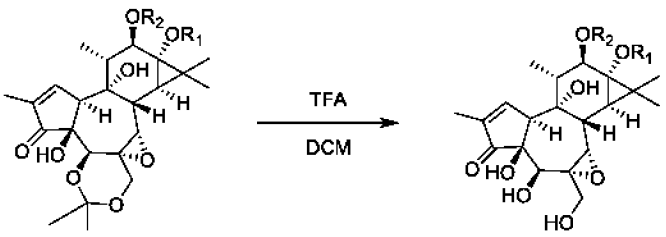
Удаление защитной группы

1.



5,20-ацетонид-12-бензоат-13-[(S)-(+)-2-метилбутират E (637 мг; 1,02 ммоль) добавляли к свежеприготовленному раствору $HClO_4$ в MeOH [1,5 < pH < 2,0]. После перемешивания в течение 6-24 часов реакционную смесь нейтрализовали ацетатом натрия, фильтровали и выпаривали до приблизительно 1/20 от исходного объема. Добавляли EtOAc (10 мл) и раствор промывали 2N H_2SO_4 (30 мл) и затем раствором NaCl (30 мл). После сушки (Na_2SO_4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc - →4:6 в качестве элюента) с получением 12-бензоат-13-[(S)-(+)-2-метилбутирата F (соединение 23) в виде белого порошка.

2.



Реакция с 12-ацетил-13-*N*-метилантраноил-5,20-ацетонидом как представлено: к раствору 12-ацетил-13-*N*-метилантраноил-5,20-ацетонида (100 мг; 0,16 ммоль) в CH2Cl2 (10 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (TFA) (300 мкл, 3% об./об.). После перемешивания приблизительно 12 часов реакционную смесь обрабатывали промыванием [NaHCO3 (≈10 мл) + солевой раствор (≈40 мл)] и затем солевым раствором (2x ≈40 мл). После сушки (Na2SO4), фильтрования и выпаривания остаток очищали с помощью хроматографии на гравитационной колонке с силикагелем (PE/EtOAc 8:2→2:8 в качестве элюента) с получением 12-ацетил-13-(N-метилантраноил)-тиглиана, 69 мг (75%) в виде белого порошка.

Соединения 21, 22, 23, 28, 45, 47, 48, 50, 51, 52 и 53 получали этими способами.

Соединение 21

Соединение 22

Соединение 23

Соединение 27

Соединение 28

Соединение 41

Соединение 42

Соединение 43

Соединение 44

Соединение 45

Соединение 46

Соединение 47

Соединение 48

Соединение 49

Соединение 50

Соединение 51

Соединение 52

Соединение 53

Соединение 60

HPLC: Колонка C18 Kinetex, 4,6 мм, 0,8 мл/мин, метанол-вода (70:30). Время удерживания: 10,9 минут.

Примеры воздействия *in vitro* на типы клеток, участвующих в заживлении ран

***Пример 4. Закрытие царапин и миграция фибробластов* in vitro**

Способность неонатальных фибробластов крайней плоти (NFF) раннего пассажа, культивированных в среде эмбриональной бычьей сыворотки RPMI 1640-10%, мигрировать через рану, представляющую собой царапину, сделанную в слившемся монослое, после обработки очищенными соединениями или растительными экстрактами определяли с применением одного или нескольких из следующих трех способов.

Способ 1

Клетки высевали в лунки с диаметром 16 мм (24-луночные планшеты), позволяли произойти сливанию и делали 2 царапины в каждой лунке с применением наконечника стерильной пластиковой пипетки. Среду удаляли,

лунки промывали фосфатно-солевым буфером pH 7,2 (PBS) для удаления смещенных клеток, добавляли свежую среду с последующими серийными 10-кратными разведениями чистого соединения или растительного экстракта (2 мкл). Инкубацию продолжали в течение от 16 до 30 ч. Эксперимент завершали, когда края царапин необработанных культур были закрыты на примерно 25% от первоначального разрыва. Монослои промывали PBS, фиксировали этанолом и окрашивали 0,05% кристаллическим фиолетовым. Распечатывали микрофотографии каждой лунки (микроскоп Evos) и каждую царапину измеряли в 3 местах для определения средней ширины. Ускоренное закрытие ран считали значительным, если оставшийся разрыв составлял <40% разрыва необработанных контролей.

Способ 2

Клетки высевали в лунки с диаметром 6 мм (96-луночные планшеты) или с диаметром 16 мм (24-луночные планшеты), с от 2 до 6 повторными лунками/разведение и обрабатывали, как в способе 1. Сразу после обработки края царапин обозначали на нижней стороне лунки тонким точечным фломастером. После фиксации и окрашивания оценивали миграцию под микроскопом с помощью масштабной сетки, подсчитывая миграцию как 0, 25, 50, 75 или 100% (полное закрытие) от первоначальной ширины. Ускоренное закрытие раны считали значительным, если средний квартиль повторов был меньше, чем у необработанных контролей ($p < 0,05$, т-тест). Кроме того, участки "раны" создавали путем посева клеток в присутствии штифтов 3 мм из нержавеющей стали (96-луночный планшет) или путем вставки тефлоновых колец с плоскими краями. Эти устройства удаляли после инкубации клеток NFF в течение ночи.

Способ 3

Клетки высевали и обрабатывали в 96-луночных планшетах, как в способе 2 (5 повторных лунок на разведение), за исключением того, что царапины делали в одно действие инструментом, имеющим 96 штифтов с тефлоновым покрытием

толщиной 1 мм (Essen Bioscience Woundmaker). Затем планшет помещали в увлажненную атмосферу при 37°C, 5% CO_2 в прибор IncuCyte FLR, запрограммированный сфотографировать каждую лунку в соответствии с фазовым контрастом через интервалы в 3 ч в течение 42 часов. Программное обеспечение определяло начальные границы царапины и скорость их закрытия. Ускоренное закрытие ран считали значительным, если начальная скорость закрытия составляла > 10%, чем у необработанных контролей.

Результаты представлены в таблицах 7-9.

Таблица 7. Скорость закрытия царапин на неонатальных фибробластах человека после обработки чистыми соединениями

Соединение	Способ 1		Способ 2		Способ 3	
	Испытуемая концентрация (нг/мл)	% закрытия по сравнению с контролем	Испытуемая концентрация (нг/мл)	% закрытия по сравнению с контролем	Испытуемая концентрация (нг/мл)	% закрытия по сравнению с контролем
1	30	**166**	200	**180**	30	150
1	100	**146**			100	160
2	30	130			30	**147**
2	100	129				
3					200	**270**
5					30	**209**
5					200	**300**
8			200	**190**		
11					200	**270**
18					200	**220**
27			1000	**158**	2000	**130**
28					200	**140**
21					200	**200**

22					200	**400**
23					200	**130**

Серая штриховка с жирным шрифтом указывает, что скорость закрытия царапины значительно выше, чем в контрольной обработке

Все чистые соединения продемонстрировали значительно увеличенную скорость закрытия царапин по сравнению с контролем, обработанным только носителем.

Таблица 8. Скорость закрытия царапин на неонатальных фибробластах человека после обработки нефракционированными спиртовыми экстрактами из различных частей растения *Fontainea picrosperma*

Часть Растения	Способ 1		Способ 2		Способ 3	
	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем
лист	5000	**268**	5000	**300**	5000	**220**
стебель	5000	**367**				
кора	500	**397**	500	**200**		
эндосперм	500	128	500	**270**		
внеплодник	500	**167**				
Незрелый плод	5×10^4	**300**				

Серая штриховка и жирный шрифт указывают, что скорость закрытия царапины значительно выше, чем в контрольной обработке

Спиртовые неочищенные экстракты всех частей растения *Fontainea picrosperma*, которые были исследованы, показали значительно увеличенную скорость закрытия царапин по сравнению с контролем, обработанным только носителем.

Таблица 9. Скорость закрытия царапин на неонатальных фибробластах человека после обработки нефракционированными спиртовыми экстрактами различных частей растения трех различных видов растений

Часть растения	Способ 1		Способ 2		Способ 3	
	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем	Разведение экстракта	% закрытия по сравнению с контролем
Fontainea australis						
лист					500	**163**
стебель					5000	**203**
Fontainea rostrata						
лист	500	101			500	**141**
Hylandia dockrillii						
лист	5000	**187**				
стебель	500	**390**			500	**129**
кора	500	**192**	5000	121		
плод	500	**385**				

Серая штриховка и жирный шрифт указывают, что скорость закрытия царапины значительно выше, чем в контрольной обработке

Экстракты из частей растений двух других видов *Fontainea*, *F. australis* и *F. rostrata*, и тесно связанного вида *Hylandia dockrillii* продемонстрировали значительно увеличенную скорость закрытия царапин по сравнению с контролем, обработанным только носителем.

Кроме того, изучение испытуемых планшет под микроскопом (способ 1) привело к выводу, что фибробласты демонстрировали явную разницу в шаблоне окрашивания после обработки соединением 1. Более тщательное исследование показало, что это происходило из-за очевидно растущих клеток в многослойном образце, потенциально указывая на потерю контактного торможения,

увеличение пролиферации или возможности ремоделирования. Примеры закрытия царапин при обработке контролем и соединением 1 через 24 часа после возникновения царапины проиллюстрированы на фигурах 1 и 2 соответственно.

Пример 5. Исследование инвазии в матригель на миграционную способность неонатальных фибробластов человека

Камеры для инвазии в матригель обеспечивают клеткам условия, при которых возможно оценить их инвазивную способность *in vitro*. Камеры для инвазии в матригель состоят из парного культурального планшета с вкладышами для клеточной культуры, содержащие мембрану PET с размером пор 8 мкм с тонким слоем мембранного матрикса матригеля. Матрикс матригеля служит восстановленной базальной мембраной *in vitro*. Слой закупоривает поры мембраны, блокируя миграцию неинвазивных клеткок через мембрану. В противоположность, инвазивные клетки способны отделяться друг от друга и внедряться в матрикс матригеля и поры мембраны с размером 8 мкм. Мембрану можно обработать для световой и электронной микроскопии и можно легко удалить после окрашивания.

Камеры использовали в соответствии с инструкциями производителя, как описано ниже в двух исследованиях, для оценки воздействия соединений 1, 2, 5 и 42 на миграцию неонатальных фибробластов человека. В первом исследовании оценивали воздействие трех концентраций (0, 10 и 30 нг/мл) соединения 1 на неонатальные фибробласты в лунках, содержащих среду с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Во втором исследовании применяли две концентрации (0 и 30 нг/мл) для каждого из соединений 1, 2, 5 и 42 для оценки воздействия на миграцию неонатальных фибробластов, истощенных в течение 2 дней до обработки, а затем перемещенных в среду с 1% эмбриональной бычьей сывороткой.

Регидратация

Пакет, содержащий камеры, перемещали из условий хранения -20°C и оставляли достигнуть комнатной температуры. Теплую (37°C) культуральную среду на основе бикарбоната добавляли во внутрь вкладышей (500 мкл) и на дно лунок (750 мкл). Камеры, содержащие матригель, оставляли увлажняться в течение 2 часов в увлажняющем инкубаторе для тканевых культур, при 37°C, в атмосфере 5% CO_2. После регидратации среду осторожно удаляли отсасыванием, не нарушая слой Matrigel™ Matrix на мембране.

Исследования инвазии

Клетки собирали и ресуспендировали до 20000 клеток на мл. В общей сложности 250 мкл клеточной суспензии помещали внутрь вкладышей (5000 клеток). Дополнительные 250 мкл среды, содержащей соответствующие соединения, затем добавляли во внутрь вкладыша с получением желаемых конечных концентраций для каждого из двух исследований. В общей сложности 750 мкл среды, содержащей соответствующие концентрации каждого соединения в каждой обработке, помещали в лунку под соответствующим вкладышем. Камеры матригель затем инкубировали в течение 24 часов в увлажняющем инкубаторе для тканевых культур при 37°C, в атмосфере 5% CO.

Измерение клеточной инвазии

Не внедренные клетки удаляли с верхней поверхности мембраны путем "чистки". Ватный тампон с наконечником погружали во вкладыш после удаления среды и применяли устойчивое давление, в то время как наконечник передвигали по поверхности мембраны. Чистку повторяли со вторым тампоном, смоченным PBS. Клетки, которые внедрились на внешнюю поверхность вкладыша, затем фиксировали путем размещения в 500 мкл 100% метанола в течение не менее 5 мин. Вкладыши затем переносили в парный планшет, содержащий 500 мкл 0,1% кристаллического фиолетового в метаноле, и окрашивали в течение не менее 15 минут. Вкладыши обесцвечивали пропусканием через 3 парных планшета, содержащих 500 мкл воды, перед высушиванием на воздухе.

На следующий день мембраны удаляли из корпуса вкладыша посредством переворачивания вкладыша и введение кончика лезвия острого скальпеля через мембрану на краю прилегающей к стенке корпуса. Корпус вкладыша вращали против неподвижного лезвия и освобождали мембрану. Мембрану подбирали из корпуса щипцами и помещали лицевой стороной на 10 мкл раствора глицерина Кайзера, и покрывали покровным стеклом. Стрипы высушивали в течение ночи перед подсчетом внедренных клеток.

Результаты

В первом исследовании фибробласты, обработанные либо 10 нг/мл либо 30 нг/мл соединения 1, показали повышенную миграционную способность в системе камеры для инвазии в матригель (MICS) по сравнению с клетками, обработанными лишь носителем (фигура 3). Второе исследование подтвердило результаты первого исследования с соединением 1 и продемонстрировало сходные уровни повышения миграционной способности для соединений 2, 5 и 42 (таблица 10).

Таблица 10. Исследование инвазии в матригель клеток неонатальных фибробластов человека, обработанных 30 нг/мл каждого соединения. Данные выражены в виде % увеличения мембранной инвазии по сравнению с лишь носителем в качестве контроля, плюс или минус стандартные отклонения от двух повторных экспериментов. Клетки подсчитывали через 24 часа инкубации.

Соединение	Количество клеток как % контроля (Контроль = без добавления соединений)
1	356 ± 141
2	366 ± 122
5	218 ± 21
42	350 ± 101

Пример 6. Репопуляция при царапине и закрытие иммортализованными кератиноцитами человека (HaCaT) in vitro

Способность иммортализованных клеток кератиноцитов человека (HaCaT) мигрировать через рану в виде царапины, сделанную в слившемся монослое, после обработки либо соединением 1 либо соединением 37 определяли с помощью следующего способа.

Трипсинизированные клетки HaCaT высевали при плотности клеток $7,4x10^4$ клеток/мл в 24-луночные плоскодонные планшеты для тканевой культуры BD Falcon (VWR International, Великобритания) в 1 мл среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с добавлением L-глютамина (2 мМ), антибиотиков (100 ед/мл пенициллин G натриевой соли, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина B); и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (все Invitrogen Ltd., Великобритания) с получением плотности клеток $7,4x10^4$ клеток, посеянных в каждой лунке. Затем клетки выдерживали при 37°C в атмосфере 5% CO_2/95% воздуха в течение ночи. На следующее утро DMEM, содержащую 10% эмбриональную бычью сыворотку, заменяли DMEM, лишенной сыворотки, и клетки HaCaT впоследствии становились лишенными сыворотки в DMEM в течение 48 ч.

После 48 ч DMEM, лишенную сыворотки, удаляли и делали "рану" в виде единичной царапины с помощью стерильной пипетки через каждый клеточный слой. После двукратной промывки в 1 мл PBS среду (1 мл), содержащую соединение 1 или соединение 37, добавляли в каждую лунку. Эта среда состояла из DMEM, дополненной L-глутамином (2 мМ), антибиотиков (как в описании выше) и 1% эмбриональной бычьей сыворотки, в дополнение к соединению 1 или соединению 37 в конечных концентрациях 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 10 или 100 мкг/мл. Делали три повторных лунки на концентрацию для каждого соединения.

Культуру HaCaT поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO_2/95% воздуха и репопуляцию в оголенных "раневых" областях отслеживали покадровой конфокальной микроскопией (конфокальный микроскоп Leica TCS SP5, Leica Microsystems UK Ltd., Великобритания) при 100-кратном увеличении, с цифровыми изображениями, снятыми в фиксированных позициях каждые 20

мин в течение периода 48 ч. Последовательности цифровых изображений экспортировали и получали .avi видеофайлы, применяя программное обеспечение LAS AF (Leica Microsystems). Скорость закрытия раны в HaCaT *in vitro* измеряли количественно с помощью программного обеспечения ImageJ (ImageJ 1,37v; http://rsb.info.nih.gov/ij/). Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа One Way с тестом Тьюки после испытания. Каждый эксперимент проводили на 3 отдельных случаях.

Через 48 часов после нанесения, соединение 1 значительно увеличило скорость закрытия царапин ($p<0,01$) по сравнению с контрольной обработкой при концентрации 0,001, 0,01 и 0,1 нг/мл (таблица 11). Через 48 часов соединение 37 также увеличило скорость закрытия царапин ($p<0,01$) по сравнению с контрольной обработкой при концентрации 0,001, 0,01, 0,1 и 1,0 мкг/мл (таблица 11).

Таблица 11. Степень репопуляции при царапине и закрытие иммортализованными клетками кератиноцитов человека (HaCaT) через 48 часов после обработки в диапазоне концентраций соединением 1 и соединением 37. Данные представлены как % от области раны с царапиной, оставшейся открытой после обработки (± стандартные ошибки).

Соединение	Концентрация соединения (соединение, мкг/среда роста, мл)					
	0	0,001	0,01	0,1	1,0	10
1	43,8±3,6	8,6±9,4	19,7±9,3	21,4±5,8	35,4±7,9	45,5±7,3
37	49,5±5,4	4,3±4,1	0,9±1,5	2,2±3,4	30,0±5,3	37,1±7,1

Для определения наличия воздействия соединения 1 и соединения 37 на повышение репопуляции при царапине и закрытие, как показано в таблице 11, опосредованных клеточной пролиферацией или миграцией, проводили два дальнейших эксперимента. Первый из этих экспериментов рассматривал

аспекты миграции и повторял исследование репопуляции при царапине, но с добавлением 1мг/мл митомицина С к среде в то же время, когда применяли соединения. Митомицин С, как известно, ингибирует клеточную пролиферацию, в том числе в клетках HaCaT; и был определен, как не оказывающий цитотоксического действия в системе культуры при концентрации 1 мкг/мл. Результаты этого исследования миграции показали увеличенную ($p<0,05$) репопуляцию при царапине и закрытие при концентрациях от 0,001 до 1,0 мкг/мл для обоих из соединения 1 и соединения 37.

Эксперимент на пролиферацию оценивал воздействие двух соединений на пролиферацию HaCaT (измеренное с помощью MTT) в системе культуры в 4 периодах времени (24, 48, 120 и 168 ч). Оба из соединений 1 и 37 оказывали значительное воздействие ($p<0,01$) на увеличение пролиферации клетки HaCaT в диапазоне концентраций от 0,001 до 10 мкг/мл по сравнению с обработкой контролем без добавления соединения.

Эти результаты показывают, что как пролиферация, так и увеличенная миграция клеток были вовлечены в процесс репопуляции при царапине и процесс закрытия в присутствии соединений 1 и 37.

Пример 7. Дифференциация моноцитов в макрофаги в присутствии соединений

Макрофаги играют множество ролей в заживлении раны, включая удаление клеточного дебриса и некротических тканей на начальном этапе воспаления с последующей поддержкой пролиферации клеток и восстановления тканей во время более поздних стадий заживления. Фенотип M1 считается связанным с ранней стадией воспаления и фенотип M2 - со стадией заживления.

Для определения потенциального воздействия соединения 1 и пятнадцати других соединений эпокси-тиглиана в порядке дифференциации моноцитов, выделяли мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) с помощью седиментации Ficoll-Paque гепаринизированной крови 72-летнего

мужчины-донора и высевали 100000 клеток/лунку в среде RPMI-1640 10% FCS. Дубликаты лунки обрабатывали 10-кратными разведениями соединений и инкубировали при 37°C в течение 4 дней. Лунки оценивали визуально на фиксацию клеток и морфологию, а затем дважды промывали PBS, окрашивали сульфородамином и подсчитывали количество пятен в ELISA ридере. Затем планшеты промывали водой и окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым в метаноле для получения фотографии и подсчета морфологии прикрепленных клеток.

Результаты эксперимента доза-ответ с PBMC человека (таблица 12) показали, что все шестнадцать испытуемых соединений эпокси-тиглиана способствовали дифференциации моноцитов периферической крови в макрофаги при концентрации в нг, о чем можно судить по адгезии и морфологии, которая представляла собой смесь дендритных клеток, характерных для фенотипа M2, и округлых клеток, характерных для фенотипа M1.

Таблица 12. Конечная концентрации в серии разведений для индукции фенотипа макрофага в моноцитах периферической крови человека соединениями эпокси-тиглиана в списке по порядку.

Соединение	Конечная точка дифференциации (нг/мл)
1	1
2	1
3	10
5	1
8	10
21	10
22	100
23	1
24	1
41	0,1
42	1

49	1
50	1
51	1
52	10
53	100

Пример 8. Воздействие соединений 1 и 37 на дифференциацию фибробластов кожи взрослого человека в миофибробласты

Фибробласты играют центральную роль в процессе заживления раны и при активации они дифференцируются в миофибробластический фенотип, который характеризуется экспрессией актина □-гладкой мускулатуры (-SMA). В то время как миофибробласты способствуют восстановлению ткани и закрытию ран, их сверх экспрессия ведет к нарушению заживления и чрезмерному рубцеванию.

Воздействие соединений 1 и 37 на дифференциацию фибробластов кожи в миофибробласты изучали по степени экспрессии □-SMA TGF-□-стимулированными фибробластами кожи.

Способы

После обработки трипсином фибробласты высевали в 8-луночные предметные стекла Permanoxchamber (VWR International) в среду DMEM, содержащую антибиотики, 2 мМ L-глутамина и 10% эмбриональную бычью сыворотку (250 мкл, все приобретено у Invitrogen), при плотности клеток $2,5x10^4$ клеток/лунку и выдерживали при 37°C в 5% CO_2/95% воздуха в течение 48 часов.

Через 48 ч фибробласты подавляли в росте в бессывороточной среде DMEM в течение 48 ч, которую затем заменяли на бессывороточную среду DMEM (250 мкл), содержащую соединения 1 или 37 в концентрации 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 и 10,0 мкг/мл (3 лунки/концентрацию/соединение) и TGF-□ (10 нг/мл, Peprotech). Фибробласты выдерживали при 37°C в 5% CO_2/95% воздуха в течение 72 часов.

Через 72 часа лунки предметного стекла промывали PBS (x1, 250 мкл) и фиксировали в 4% параформальдегиде (100 мкл/лунку) в течение 10 минут. Лунки предметного стекла затем снова промывали PBS (x1, 250 мкл), обрабатывали 0,1% Тритоном X-100 в PBS (100 мкл, Sigma) в течение 5 мин и повторно промывали PBS (x1, 250 мкл). Лунки блокировали 1% BSA в PBS (250 мкл, Sigma) в течение 1 ч и промывали (x3) в 0,1% BSA/PBS.

Лунки инкубировали с мышиными моноклональными антителами к α-SMA человека, клон 1A4 (1:100, 150 мкл, Sigma) при 4°C в течение ночи, промывали (x6) в 0,1% BSA/PBS и инкубировали с козьим антителом к IgG мыши меченным Alexa Fluor 488 (1:1000, 250 мкл, Invitrogen) при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Предметные стёкла промывали (x6) в 0,1% BSA/PBS и окрашивали контрастным раствором Hoescht 33258 в течение 30 мин в темноте (1:2000, 250 мкл, Sigma). Впоследствии предметное стекло удаляли и обрабатывали Fluorsave (Santa Cruz) в течение 10 минут в темноте. Микропрепараты просматривали с помощью флуоресцентной микроскопии (Leica Microsystem) с получением цифровых изображений при увеличении x200. Цифровые изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения HC Image J.

Результаты

При обработке контролем с TGF-β_1, но без добавления соединений, фибробласты кожи взрослого человека дифференцированные в миофибробласты, как правило, характеризовались повышенной экспрессией α-SMA, скоплением стресс-волокна α-SMA и общим развитием увеличенной, многоугольной клеточной морфологии. В противоположность этому, воздействие соединения 1 и соединение 37 на фибробласты кожи взрослого человека, обработанных TGF-β_1, приводило к дифференциации в миофибробласты в зависимости от концентрации. В случае применения соединения 1 в концентрации 0,1 мкг/мл, в культурах фибробластов отсутствовало образование стресс-волокна α-SMA и типичная многоугольная клеточная морфология, представляющая

миофибробластную дифференциацию (фигура 5). При применении соединения 37 наблюдали разрушительное воздействие на образование стресс-волокна α-SMA и развитие многоугольной морфологии при концентрации 10 мкг/мл (фигура 6).

Кроме того, были обнаружены другие едва заметные изменения в морфологии миофибробластов в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкг/мл для соединения 1 и от 0,1 до 1,0 мкг/мл для соединения 37 (фигуры 5 и 6).

Конкретные воздействия соединений на дифференциацию фибробластов/миофибробластов могут иметь отношение к минимальному образованию рубца, наблюдаемому в ранах, обработанных *in vivo* соединением 1 (примеры 16 и 17).

Пример 9. Индукция выброса активного кислорода нейтрофилами в ответ на соединение 1

Нейтрофилы представляют собой специализированные фагоциты врождённой иммунной системы и их приток и активация имеет важное значение для уничтожения бактерий, грибов и клеточного дебриса на ранних стадиях заживления раны. Широкая антимикробная активность нейтрофилов основывается на нескольких стратегиях, включая выброс активных форм кислорода (ROS).

Было проведено исследование на оценку потенциального воздействия соединения 1 на индукцию выброса активного кислорода нейтрофилами.

Нейтрофилы выделяли из свежей крови здорового донора-человека в результате лизиса осадка эритроцитов, который получали с помощью седиментации Ficoll-Paque. Нейтрофилы (~ 4 x 10^6 клеток/мл) инкубировали с 10 мкг/мл дигидроэтидиума (DHE) (Sigma-Aldrich) в полной культуральной среде при 37°C в течение 15 мин паралельно с аликвотой неокрашенных клеток для исследования в качестве неокрашенного контроля. После инкубации следовала обработка соединением 1 в диапазоне концентраций (0,1 нг/мл, 10 нг/мл, 100

нг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл) в течение 15 мин. Генерацию активных форм кислорода после инкубации определяли с помощью проточного цитометра FACS Canto, измеряя флуоресценцию в результате окисления DHE до этидиум-иона.

Это исследование не обнаружило образование ROS при контрольной обработке в отсутствии соединения 1. В противоположность этому, соединение 1 индуцировало значительное образование активных форм кислорода (ROS) в зависимости от дозы, с увеличением образования ROS при увеличении концентрации соединения 1.

Примеры воздействия соединений на белки, гены и цитокины, имеющие отношение к улучшению результатов заживления раны

Пример 10. Молекулярный анализ неонатальных фибробластов человека, обработанных соединениями 1 и 42

Способ Вестерн-блоттинга применяли для определения воздействия соединений 1 и 42 на белки, имеющие отношение к восстановлению и заживлению раны, в клетках неонатальных фибробластов человека (NFF). Проводили два исследования. В первом исследовании NFF обрабатывали либо 10 либо 30 нг/мл соединения 1 в течение 6 или 24 часов до сбора и выделения белка. Во втором исследовании NFF обрабатывали индивидуально при концентрации 30 нг/мл соединений 1 и 42 соответственно в течение 6 часов. Лизаты, полученные из обоих исследований, анализировали с помощью Вестерн-блоттинга и испытанием специфических антител к ключевым сигнальным молекулам, участвующим в восстановлении и заживлении раны.

Подготовка образцов белка для Вестерн-блоттинга

Среду для прикрепленных неонатальных фибробластов человека, выращенных в планшетах размером 75 $см^2$, удаляли и клетки промывали дважды в ледяном холодном PBS. Прикрепленные клетки собирали в 10 мл охлаждённого на льду PBS с помощью клеточного скребка (Costar®, Corning), осаждали

центрифугированием в течение 5 мин (1500 оборотов в минуту, комнатная температура), ресуспендировали в 1 мл охлаждённого на льду PBS и переносили в пробирку для микроцентрифуги на 1,5 мл. Клетки собирали центрифугированием (13200 оборотов в минуту, комнатная температура, 2 с), PBS удаляли и осадок хранили при -20°C до момента применения.

Замороженные осадки оттаивали на льду и вновь суспендировали в объеме буфера для лизиса клеток, который в 3-4 раза больше объема осадка, с помощью переливания из пипетки вверх и вниз. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком в течение 60 с при 4°C и центрифугировали в течение 20 мин (13200 оборотов в минуту, 4°C) и межфазную границу, содержащую белок, переносили в новую пробирку для микроцентрифуги на 1,5 мл. Белок хранили при -20°C.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли с применением набора для анализа белка BCA (Pierce). Этот способ основан на восстановлении Cu^{2+} до Cu^{1+} белком в щелочном растворе. Восстановленный Cu^{1+} впоследствии образует хелатный комплекс с бицинхониновой кислотой (BCA) с образованием продукта реакции фиолетового цвета.

Образцы белка разводили 1/10 и 1/20 (об./об.) в воде MilliQ и 10 мкл высевали в двух повторностях в 96-луночный планшет с плоским дном (Costar®, Corning). Готовили исходные растворы альбумина бычьей сыворотки (BSA) при 100, 200, 400, 600, 1000 и 1200 мкг/мл и высевали 10 мкл/лунку в двух повторностях, и анализировали вместе с образцами. Рабочий реактив BCA получали путем смешивания 50 частей реактива A с 1 частью реактива B и вносили аликвоту в 100 мкл в каждую лунку. Планшет инкубировали при 37°C в течение 30-45 мин, чтобы произошла реакция. Поглощение вещества считывали при A590 нм на микропланшет-ридере (VersaMax, Molecular Devices) и получали калибровочную кривую с применением программного обеспечения SOFTmax PRO (Molecular Devices). Концентрации неизвестных образцов оценивались по кривой.

Электрофорез в полиакриламидном геле SDS (SDS-PAGE).

Образцы белка получали путем смешивания с соответствующим объемом загрузочного буфера 2X SDS и денатурировали путём нагревания в течение 10 мин при 70°C. Гель-электрофорез SDS-PAGE проводили с применением прибора с двумя гелевыми пластинами Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories), как описано Laemmli (6). Разделяющий гель состоял из 0,275 M Трис-HCl (pH 8,8), 0,1% (вес/об.) SDS, 0,05% (вес/об.) свежеприготовленного персульфата аммония, 1% (об./об.) TEMED и от 7,5 до 12% (вес/об.) акриламида/бис-акриламида (29:1). Раствор доводили до 5 мл с помощью H_2O MilliQ и выдерживали в течение по меньшей мере 30 мин (комнатная температура), наслаивая насыщенный водой бутанол. Перед заливкой концентрирующего геля насыщенный водой бутанол сливали. Концентрирующий гель состоял из 0,125 M Трис-HCl (pH 6,8), 0,1% (вес/об.) SDS, 0,05% (вес/об.) свежеприготовленного персульфата аммония, 0,1% (об./об.) TEMED и 4% (вес/об.) акриламида/бис-акриламида (29:1). Раствор доводили до 2,5 мл на гель с помощью H_2O MilliQ, выливали поверх разделяющего геля и оставляли с 10-луночной гребенкой (Bio-Rad Laboratories) по меньшей мере на 30 мин. Электрофорез проводили в течение примерно 1 часа или до момента, пока краситель не стечёт на дно геля (200 V, комнатная температура) в рабочий буфер1X SDS.

Вестерн-блоттинг

После SDS-PAGE электрофореза пластины геля осторожно разделяли, концентрирующий гель отрезали и переносили в ячейки системы Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). "Сэндвич передачи" собирали следующим образом: пористая губка, два листа фильтровальной бумаги (Whatmann), нитроцеллюлозная мембрана, гель, еще два листа фильтровальной бумаги и другая пористая губка, и вставляли в устройство передачи. Губки, мембрану и фильтровальную бумагу предварительно смачивали в холодном буфере электроблоттинга и предпринимали меры для предотвращения образования каких-либо воздушных пузырьков, которые могли привести к

несоответствующему передвижению белков. Передвижение белков проводили при 100 В в течение 1 ч (постоянный ток) в охлаждённом на льду буфере передачи при 4°С с нитроцеллюлозной мембраной (Hybond™-C, Amersham Biosciences) ближе к анионной стороне, и добавляли пакет льда и магнитную мешалку.

Исследование белковых мембран

После передачи мембрану инкубировали в 5% (вес/об.) Blotto в 0,1% (об./об.) Tween 20/TBS при комнатной температуре по меньшей мере 30 мин при осторожном орбитальном встряхивании, чтобы блокировать неспецифические участки связывания. Первичное антитело разводили в 5% (вес/об.) BSA в соответствии с рекомендациями производителя (см. таблицу 13 ниже) до конечного объема 2 мл. Готовили пластиковый конверт, содержащий мембрану и антитело, и закрывали термическим способом, удаляя как можно больше пузырьков воздуха. Конверты подвергали вращению в роторе, сделанному на заказ, в течение ночи (примерно 16 ч) при 4 °С.

Удаляли мембрану из пакета, помещали в пластиковый лоток с 0,1% (об./об.) Tween 20/TBS и промывали четыре раза при комнатной температуре с энергичным орбитальным встряхиванием в течение 15 мин на каждую промывку. Соответствующее вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), отбирали на мембрану путем разбавления 1/1000 в 5% (вес/об.) Blotto в 0,1% (об./об.) Tween 20/TBS и помещали его в новый пластиковый конверт, который подвергали вращению при комнатной температуре в течение 2 часов.

Обнаружение белков иммунным способом

Для удаления любого несвязанного или неспецифически связанного антитела мембрану промывали в 0,1% (об./об.) Tween 20/TBS при комнатной температуре четыре раза в течение 15 мин каждый раз. Реактив Western Lighting™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences) использовали для

получения обнаруживаемого сигнала от вторичных антител, меченных HRP. Действие реактива основано на окислительной деградации люминола, катализируемой HRP, в результате чего происходит излучение света, которое можно обнаружить при 420 нм и зафиксировать на пленке. Равные объемы из бутылки 1 и бутылки 2 смешивали непосредственно перед обнаружением. Общий объем в 2 мл наносили на мембрану и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин. Предпринимали меры, чтобы подвергнуть воздействию всю мембрану в равной степени. Мембрану удаляли, быстро сушили на фильтровальной бумаге, помещали между двумя частями полипропиленовых файлов в кассету для плёнок (Hypercassette ™, Amersham Biosciences) и подвергали облучению часть пленки (SuperRX, Fujifilm). Применяли первичное воздействие в течение 2 мин для оценки оптимального времени обнаружения. Плёнку проявляли в Kodak Image Station (Kodak).

Таблица 13. Антитела, применяемые в данном исследовании

Антитело	**Хозяин**	**Применяемое разведение**	**Производитель**
Антитело к Pan-Phospho PKC	Кролик	1:1000	Cell Signalling
Антитело к Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	Кролик	1:1000	Cell Signalling
Антитело к ERK	Кролик	1:1000	Cell Signalling
Антитело к Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Кролик	1:1000	Cell Signalling
Антитело к MEK1/2	Кролик	1:1000	Cell Signalling
Антитело к MMP9	Кролик	1:1000	Cell Signalling
HRP-коньюгированное антитело к Ig кролика	Баран	1:1000	Cell Signalling

В первом исследовании с соединением 1 Вестерн-блоттинг показал переходную активацию как MEK1/2, так и ERK1/2 через 6 часов после обработки либо 10 нг/мл либо 30 нг/мл соединения 1, и последующую пониженную регуляцию активации через 24 часа после обработки. Активация ветви MEK/ERK пути MAP-киназы известна влиянием на миграционный фенотип многих клеточных типов, включая фибробласты. Никакой разницы в уровне MMP9 не обнаружили.

Подобные модели фосфорилирования фосфо-ERK были найдены при Вестерн-блоттинге во втором исследовании при концентрации 30 нг/мл соединений 1 и 42 на NFF.

Пример 11. Воздействие соединения 1 на экспрессию генов, вовлеченных в заживлении раны

Воздействия соединения 1 на экспрессию генов, ассоциированных с заживлением раны, исследовали в двух ситуациях: (a) PBMC человека и (b) ксенотрансплантатные модели опухоли человека на мышах.

Материалы и способы

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли с помощью седиментации Ficoll-Paque гепаринизированной крови 68-летнего мужчины-донора и культивировали в RPMI-1640 10% FCS. После обработки соединением 1 в концентрации 30 нг/мл монослой промывали один раз фосфатно-солевым буфером (PBS) и собирали клетки с помощью стерильных скребков, и хранили в виде осадка при -80˚C.

Ксенотрансплантатные модели опухоли человека на мышах получали от мышей, которым подкожно вводили клеточную линию меланомы человека Sk-Mel-28 в 2 участка боковой поверхности живота для каждой мыши из линии BALB/c *Foxn1nu* (2 x 10^6 клеток/участок) и оставляли расти до диаметра примерно 7 мм. Каждую опухоль затем обрабатывали путем инъекции 50 мкл 20% пропиленгликоля, содержащего 30 мкг соединения 1, или 50 мкл 20% пропиленгликоля. В разные моменты времени после инъекции мышь подвергали

эвтаназии и собирали опухоли, удаляли кожное покрытие и интактные опухоли хранили при -80˚C

Экстрагировали РНК из 30 мг замороженной опухоли или 1 x 10^7 клеток с применением набора QiagenRNeasyPlus Mini Kit, в соответствии с инструкциями производителя, затем определяли количественно с помощью прибора NanoDrop и подтверждали целостность на денатурирующем агарозном геле, содержащем 1 т.н. ДНК-маркера и окрашенном этидиумбромидом.

Амплификация РНК и маркировка.

Примерно 500 нг общего количества не меченной РНК доводили до конечного объема 11 мкл водой, не содержащей нуклеазу. РНК инкубировали с 9 мкл мастер–микса обратной транскриптазы (1 мкл праймера T7 Oligo (dT), 2 мкл 10X буфера первой цепи, 4 мкл смеси дНТФ, 1 мкл ингибитора РНКазы и 1 мкл ArrayScript) при 42 °C в течение 2 ч. Затем следовала стадия синтеза второй цепи кДНК, которая предусматривала дальнейшую инкубацию при 16°C в течение 2 ч с 80 мкл мастер-микса второй цепи (63 мкл воды, не содержащей нуклеазу, 10 мкл 10X буфера второй цепи, 4 мкл смеси дНТФ, 2 мкл ДНК-полимеразы и 1 мкл РНКазы H). кДНК очищали путем фильтрования через фильтр-картридж для кДНК с 250 мкл связывающего буфера кДНК и промывания с 500 мкл промывочного буфера,, входящими в набор. Очищенную кДНК элюировали 20 мкл воды, не содержащей нуклеазы, с температурой 55˚C. Каждый образец кДНК инкубировали с 7,5 мкл мастер микса IVT (2,5 мкл 10X реакционного буфера T7, 2,5 мкл смеси ферментов T7 и 2,5 мкл смеси биотин-НТФ) при 37°C в течение 16 ч. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл воды, не содержащей нуклеазы, к каждому образцу кРНК. Биотинилированную, амплифицированную РНК очищали путем фильтрования образцов кРНК через фильтр-картриджи для кРНК с 350 мкл связывающего буфера кРНК и 250 мкл 100% этанола, смешанных вместе перед загрузкой в фильтры. Фильтр-картриджи для кРНК с прикрепленной РНК затем промывали 650 мкл промывочного буфера перед

элюированием очищенной кРНК с помощью 200 мкл воды, не содержащей нуклеазы, с температурой 55 ˚С.

*Гибридизация на Illumina Expression BeadChip.*Образцы кРНК нагревали при 65°С в течение 5 мин и собирали с помощью пульсирующего центрифугирования. После нагревания при 65°С в течение 5 мин примерно 750 нг образца кРНК делили на аликвоты в отдельные пробирки, в которые добавляли ~ 5 мкл воды, не содержащей РНКазы и 10 мкл Hyb Mix. Примерно 15 мкл приготовленной смеси кРНК загружали в Illumina Expression BeadChips. Последующие этапы гибридизации и промывки проводили в соответствии с руководством Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay, поставляемым Illumina.

Human HT-12 v4 Expression BeadChips охватывают более 47000 транскриптов и известных вариантов сплайсинга всего транскриптома человека. MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips охватывают примерно 25600 хорошо аннотированных транскриптов RefSeq (Reference Sequence), включающих более 19000 уникальных генов.

Анализ данных. BeadChips читали с помощью системы iScan и передавали через GenomeStudio в GeneSpring GX v12.5 (Agilent Technologies,Санта-Клара, Калифорния, США). Значения экспрессии нормализовали с помощью квантильной нормализации с настройками по умолчанию. Объекты фильтровали на основе баллов обнаружения, рассчитанных с помощью GenomeStudio, где значение $p \leq 0,05$ рассматривали как значительное.

Изменения экспрессии генов, имеющих отношение к заживлению раны, индуцированных в клетках PBMC человека соединением 1

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) богаты на лимфоциты и предшественники макрофагов (моноциты), вовлеченные в выработку цитокинов и ферментов, участвующих в ремоделировании ткани, и имеющих отношение к процессу заживления раны. В таблице 14 перечислены

изменения экспрессии генов, индуцированные 30 нг/мл соединения 1, которые были более 2 раз выше или более 2 раз ниже, чем контрольные необработанные клетки PBMC, и характеризовались известной связью с заживлением раны. Заживление раны представляет собой сложную, многоступенчатую последовательность, в которой процессы, такие как воспаление, впоследствии должны быть подавлены. Поэтому, следует отметить, что гены, представленные в таблице 14, иллюстрируют ряд соответствующих молекул, регулируемых соединением 1, в смешанной лимфоидной популяции *in vitro* без указания порядка специфической к ткани экспрессии *in vivo*.

Гены включали провоспалительные цитокины (IL-1α, IL-1β и IL-6), вовлеченные в защиту от инфекции, цитокины, формирующие воспалительный ответ (IL-10 и IL-24), факторы роста (GMCSF, CSF1 и HBEGF), а также ряд хемокинов и матричных металло-пептидаз участвующих в ремоделировании ткани (последнее обусловлено подавлением TIMP2). Подавление THBS1, при котором подавляется образование грануляционной ткани, также является положительным фактором в заживлении раны. Активация KLF10 может способствовать ангиогенезу и свидетельствует об индукции TGF-β. Трансглутаминазы (TGM) стабилизируют белки путем их сшивания и обладают другими полезными действиями в заживлении раны.

Таблица 14. Изменения экспрессии генов, имеющих отношение к результатам улучшенного заживления раны, индуцированные в PBMC человека соединением 1

Ген	**Название гена (*Homo sapiens*)**	**Время (ч)**	**Кратность изменения экспрессии**	**Направление регуляции**
IL1α	Интерлейкин 1, альфа (IL1α), мРНК.	24	14,6	Вверх
IL1β	Интерлейкин 1, бетта (IL1β), мРНК.	24	15,4	Вверх
IL6	Интерлейкин 6 (Интерферон бета-2) (IL-6), мРНК.	24	33,1	Вверх

IL10	Интерлейкин 10 (IL10), мРНК.	24	2,1	Вверх
IL24	Интерлейкин 24 (IL24), варианта 1 транскрипта, мРНК.	24	4,6	Вверх
GM-CSF	GM-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), мРНК	4	4,3	Вверх
		24	34,6	Вверх
		96	6	Вверх
CSF1	Колониестимулирующий фактор, вариант 4 транскрипта, мРНК.	24	5,1	Вверх
HBEGF	Гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HBEGF), мРНК.	4	2,7	Вверх
		24	5,1	Вверх
CXCL1	Лиганд 1 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL1), мРНК.	24	15,5	Вверх
CXCL2	Лиганд 2 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL2), мРНК.	4	3,5	Вверх
		24	73,5	Вверх
CXCL5	Лиганд 5 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL5), мРНК.	24	8,1	Вверх
		96	15,1	Вверх
CXCL7	Лиганд 7 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL7), мРНК.	24	17,5	Вверх
		96	37,4	Вверх
CXCL13	Лиганд 13 хемокина (мотив C-X-C) (CXCL13), мРНК.	24	2,2	Вверх
		96	23,5	Вверх
CCL1	Лиганд 1 хемокина (мотив C-C) (CCL1), мРНК.	24	39,8	Вверх
		96	42,6	Вверх
CCL3	Лиганд 3 хемокина (мотив C-C) (CCL3), мРНК.	24	56,9	Вверх
CCL7	Лиганд 7 хемокина (мотив C-C) (CCL7), мРНК.	4	9,4	Вверх
		24	54,5	Вверх
		96	4,8	Вверх

CCL3L1	Лиганд 3-подобный 1 хемокина (мотив C-C) (CCL3L1), мРНК.	4	5,3	Вверх
		24	72,3	Вверх
		96	4,2	Вверх
MMP1	Матриксная металлопептидаза 1 (MMP1), мРНК.	4	3,1	Вверх
		24	4,2	Вверх
MMP7	Матриксная металлопептидаза 7 (MMP7), мРНК.	4	3,5	Вверх
		24	7,4	Вверх
		96	117,3	Вверх
MMP9	Матриксная металлопептидаза 9 (MMP9), мРНК.	24	-22,9	Вниз
MMP10	Матриксная металлопептидаза 10 (стромелизин 2) (MMP10), мРНК.	4	3,2	Вверх
		24	52	Вверх
MMP19	Матриксная металлопептидаза 19, вариант 1 транскрипта, мРНК.	4	11,6	Вверх
		24	2,6	Вверх
TIMP2	Ингибитор 2 металлопептидазы TIMP (TIMP2), мРНК.	24	-10,9	Вниз
THBS1	Тромбоспондин 1 (THBS1), мРНК.	4	-47,8	Вниз
		24	-101,5	Вниз
KLF10	Kruppel-подобный фактор 10 (KLF10), вариант 1 транскрипта, мРНК.	4	5,9	Вверх
		24	9,3	Вверх
TGM3	Трансглутаминаза 3 (TGM3), мРНК.	4	2,3	Вверх
		24	28,4	Вверх
TGM2	Трансглутаминаза 2 (TGM2), вариант 1 транскрипта, мРНК.	24	12,2	Вверх
		96	4,4	Вверх
TGM5	Трансглутаминаза 5 (TGM5), вариант 2 транскрипта, мРНК.	24	-3,3	Вниз

Изменения экспрессии генов, имеющих отношение к заживлению раны, индуцированные в ксенотрансплантатной модели опухоли человека на мышах соединением 1

Отличное заживление участков опухоли у мышей и животных-компаньйонов, о чем свидетельствовало восстановление шерсти и цвета шерсти, а также минимальное рубцевание, является показательной особенностью обработки соединением 1 путем внутриопухолевой инъекции (примеры 16 и 17). Поэтому, изменения экспрессии генов, имеющих отношение к заживлению раны, анализировали в ксенотрансплантатной модели опухоли на мышах на ранних этапах после инъекции, в момент, когда опухоль все еще была интактной.

Данные экспрессии с применением мышиных геноспецифических микрочипов проводили для 2-3 отдельных ксенотрансплантатов SK-Mel-28 человека, обработанных путем внутриопухолевой инъекции 30 мкг соединения 1, наряду с 3 участками, обработанными только носителем, данные объединяли. Только те гены мыши, у которых экспрессия в участке, обработанном соединением 1, составляла более 2 раз выше или более 2 раз ниже, чем в участке с инъекцией носителем, исследовали на наличие связи с заживлением раны.

В таблице 15 перечислены гены, выбранные по выше указанным критериям и характеризующиеся известной связью с заживлением раны.

Ряд генов с известными благоприятными результатами при заживлении раны активизировались по меньшей мере в 2 раза соединением 1. Это оказались гены, участвующие в сокращении мышц (ACTA1), росте (EGR1), модуляции воспаления (CXCL1), кератины для обновления кератиноцитов (krt5, 10, 14, 15, 17, 71, krtdap), миграции кератиноцитов (Col17a1), эпидермальной дифференциации и клеточного взаимодействия (lor, Tgm2, Itga7).

Один ген, имеющий отношение к заживлению раны, Тромбоспондин 2 (Thbs2), был подавлен. Подавление этого гена связано с увеличением сосудистой плотности и увеличением фибронектина на ранних стадиях заживления раны.

Таблица 15. Изменения экспрессии генов, имеющих отношение к результатам улучшенного заживления раны, индуцированные в ксенотрансплантатной модели опухоли на мышах соединением 1

Код гена	**Название гена *(Musmusculus)***	**Время (ч)**	**Кратность изменения в экспрессии**	**Направление регуляции**
Acta1	актин, альфа-1, скелетные мышцы (Acta1), мРНК.	0,5	9,3	Вверх
		4	30,3	Вверх
		8	8,5	Вверх
Egr1	ответная реакция раннего роста (Egr1), мРНК.	4	4,7	Вверх
		8	5,34	Вверх
CXCL1	Лиганд 1 хемокина (мотив C-X-C) (Cxcl1), мРНК.	4	12,1	Вверх
krt14	кератин 14 (Krt14), мРНК.	1	9,4	Вверх
		2	5,6	Вверх
		4	9,7	Вверх
Krt10	кератин 10 (Krt10), мРНК.	1	7	Вверх
		2	2,4	Вверх
		4	8,6	Вверх
		8	2,1	Вниз
Krt17	кератин 17 (Krt17), мРНК.	1	2,9	Вверх
		4	10	Вверх
		8	2	Вниз
Krt15	кератин 15 (Krt15), мРНК.	1	2,3	Вверх
Krt5	кератин 5 (Krt5), мРНК.	1	2,8	Вверх
Krt71	кератин 71 (Krt71), мРНК.	4	3,2	Вверх
Col17a1	коллаген, тип XVII, альфа-1 (Col17a1), мРНК.	1	2,7	Вверх
		2	2	Вверх
		4	3,2	Вверх
Krtdap	ассоциация	1	7	Вверх

	дифференциации кератиноцитов (Krtdap), мРНК.			
		4	3,8	Вверх
Lce1m	мертвый ороговевший слой 1M (Lce1m), мРНК.	1	4,9	Вверх
Lce1b	мертвый ороговевший слой 1B (Lce1b), мРНК.	1	4,8	Вверх
Lce1d	мертвый ороговевший слой 1D (Lce1d), мРНК.	1	3,3	Вверх
LCe1a1	мертвый ороговевший слой 1A1 (Lce1a1), мРНК.	1	2,7	Вверх
		4	2,8	Вверх
Lce1a2	мертвый ороговевший слой 1A2 (Lce1a2), мРНК.	1	3	Вверх
Lor	лорицин (Lor), мРНК.	1	11,6	Вверх
		2	2,8	Вверх
Tgm2	трансглутаминаза 2, C-полипептид (Tgm2), мРНК.	0,5	2,67	Вверх
		4	2	Вниз
Thbs2	тромбоспондин 2 (Thbs2), мРНК.	0,5	3,98	Вниз
Itga7	интегрин альфа-7 (Itga7), мРНК.	1	2,1	Вверх

Пример 12. Влияние соединений на выработку цитокинов

Конкретные цитокины играют важную роль в процессах заживления раны и средства, модулирующие эти вещества, можно применять при лечении раны и/или для улучшения косметических результатов заживления (например, уменьшенное рубцевание). Влияние соединений 1, 2, 5 и 42 на регуляцию четырех цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-8 и TNFα), которые известны тем, что имеют решающее значение на ранних стадиях процесса заживления раны было исследовано на мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC).

Клетки PBMC выделяли с помощью седиментации Ficoll-Paque гепаринизированной крови, полученной от двух доноров-людей: 72-летнего мужчины (донора 1) и 34-летнего мужчины (донор 2). Все клетки культивировали в 10% FCS, RPMI, как описано ранее.

Клетки PBMC высевали при плотности $1,5x10^5$ клеток на лунку в 10% FCS, RPMI. Стимуляцию выработки этими клетками четырех соединений проводили при четырех концентрациях (0 нг/мл, 3 нг/мл, 30 нг/мл, 300 нг/мл) в двух повторностях в течение 24 часов в увлажняющем инкубаторе при 37°C, 5% CO_2. Образцы среды брали из каждой необходимой лунки и замораживали при -80°C до применения.

Исследования с помощью Cytometric Bead Array (CBA) применяли для измерения результатов. Исследования с помощью CBA обеспечивают способ захвата растворимого анализируемого вещества или набора анализируемых веществ с применением покрытых антителом гранул известного размера и флуоресценции. Затем выполняли обнаружение с применением другого флуоресцентно-меченного вторичного антитела с образованием сэндвич-комплекса. Каждый образец среды анализировали на присутствие растворимого IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 и TNFα, применяя набор Human Inflammatory Cytokine Detection Kit для CBA, BD (Becton Dickinson) в соответствии с инструкциями производителя. Средние величины интенсивности флуоресценции для каждого образца сравнивали с калибровочной кривой для определения концентрации цитокинов (пг/мл).

Результаты исследования с помощью CBA для каждого соединения приведены в таблице 16.

Все четыре соединения значительно повышали уровни четырех цитокинов (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8), которые были обнаружены в анализированных супернатантах из обработанных клеток PBMC, с тенденцией, согласующийся между клетками PBMC от двух доноров. Самое высокое содержание цитокинов,

в основном, обнаруживали при двух самых высоких концентрациях (30 и 300 нг/мл) соединений.

Таблица 16. Выработка цитокинов клетками PBMC после инкубации в течение 24 ч при концентрации 0, 3, 30 и 300 нг соединения /мл для соединений 1, 2, 5 и 42. Содержание цитокинов выражены в пг/мл ± стандартное отклонение и представлены для каждого из двух доноров.

Цитокин	[Соединение 1] нг/мл							
	0	3	30	300	0	3	30	300
TNFα	3,7±1,1	24,3±1,4	324,4±0,0	355,0±4,3	5,3±0,5	11,2±0,3	209,6±7,5	592,2±24,7
IL-1β	0,8±0,1	1,2±0,2	11,9±0,8	39±0,2	1,3±0,9	3,1±0,9	43,9±1,7	121,6±5,6
IL-6	4,5±0,8	9,7±1,2	34,2±1,1	89,5±13,8	10,5±1,1	8,3±0,4	12,6±0,9	38,8±9,0
IL-8	425±41	1720±157	16920±1198	16419±40	855±83	1493±2	24078±815	32021±1156
	Донор 1				Донор 2			

Цитокин	[Соединение 2] нг/мл							
	0	3	30	300	0	3	30	300
TNFα	3,8±0,7	31,15±6,9	314,07±37,9	330,0±28,7	26,2±23,9	27,3±8,3	211,5±12,4	618,1±63,7
IL-1β	0,9±0,1	1,4±1,2	12,1±0,4	37,7±4,6	5,5±3,2	6,7±1,5	52,6±5,0	123,9±1,0
IL-6	3,8±0,3	9,1±0,2	38±3,9	84,1±3,6	13,7±4,9	14,9±1,1	14,5±3,3	41,4±2,3
IL-8	430±66	2099±585	18229±2592	16634±625	4073±3881	2608±309	26401±271	34117±630
	Донор 1				Донор 2			

Цитокин	[Соединение 5] нг/мл							
	0	3	30	300	0	3	30	300
TNFα	4,3±0,6	85,8±8,4	289,9±18,6	306,4±9,0	15,4±4,2	53,9±9,0	223±11,2	620,9±66,5
IL-1β	0,6±0,1	2,1±0,1	15,7±0,9	44±1,6	4,6±0,1	8,1±2,8	43,6±6,1	114,9±2,4
IL-6	3,7±1,0	12,4±0,2	33,6±0,6	77,5±9,1	9,5±2,1	14,9±1,1	12,5±1,2	51,9±1,3
IL-8	360±22	4924±366	17190±55	17275±40	2026±206	4765±999	26288±260	33876±2532
	Донор 1				Донор 2			

Цитокин	[Соединение 42] нг/мл							
	0	3	30	300	0	3	30	300
TNFα	5,0±1,0	45,8±55,2	271,9±22,4	267,5±11,9	12,6±7,7	109,5±29,3	354,2±6,3	631,6±16,9
IL-1β	2,7±0,4	2,6±0,6	16,8±1,2	41,3±1,2	1,9±1,3	21,7±7,5	71,2±6,0	137,8±10,9
IL-6	5,1±2,5	8,1±6,4	32,1±6,7	71±4,6	10,1±1,7	30,4±11,8	23,6±0,8	69,3±1,8
IL-8	403±86	3013±377	16389±884	17425±680	1224±887	7885±2516	28176±37	32925±552
	Донор 1				Донор 2			

Примеры активности *in vivo*

Пример 13. Острый воспалительный ответ в коже мыши

Острый воспалительный ответ представляет собой важную начальную фазу процесса заживления раны. Провоспалительные клетки, в первую очередь нейтрофилы и макрофаги, мигрируют к участку и защищают его от инфекции и высвобождают цитокины и хемокины, участвующие в инициации и регуляции последующего восстановления ткани.

Голым мышам самцам вводили подкожно в каждый бок 50 мкл растворов, содержащих 100 мкг/мл соединений 1, 2, 5 и 42, соответственно, в 20% пропиленгликоле. Каждый участок краснел через 4 ч и через 24 ч пораженная площадь кожи составляла примерно 1 см в диаметре. Уплотнение образовалось в течение следующих 6 дней и через 14 дней участок полностью зажил с минимальным рубцеванием.

Острый воспалительный ответ, инициированный соединениями в коже мыши, с последующим быстрым заживлением, согласуется с наблюдаемым прямым воздействием соединений на провоспалительные клетки (примеры 7 и 9) и на экспрессию генов, а также профили цитокинов в клетках PBMC (примеры 11 и 12). Такой устойчивый, но переходной провоспалительный ответ часто ассоциируется с хорошими *in vivo* результатами заживления раны.

Пример 14. Состав геля соединения 1

Либо 30 мг либо 50 мг соединения 1 (чистота > 97% согласно HPLC) растворяли в 5 мл 99,5% изопропилового спирта (Biotech Pharmaceuticals) и выдерживали в течение ночи. Готовили раствор 0,6% Carbomer 940 (Snowdrift Farms) в качестве гелеобразующего средства в 5 мл стерильной воды. Концентрат соединения 1 и 0,6% раствор Carbomer 940 затем добавляли вместе в шприц на 20 мл и тщательно перемешивали. Затем добавляли и быстро смешивали 20 мкл 100% триэтаноламина (Sigma-Aldrich). Полученный гель соединения 1 затем

разливали в отдельные инсулиновые шприцы на 1 мл для получения доз 3 мг соединения 1/мл и 5 мг соединения 1/мл.

Пример 15. Состав геля соединения 1 для инъекций

20 мг соединения 1 (чистота >97% согласно HPLC) растворяли в 8 мл 1,2-пропандиола (Sigma-Aldrich) в стеклянном сцинтилляционном флаконе на 20 мл и выдерживали в течение ночи при комнатной температуре. 12 мл либо 30 мМ ацетатного буфера при pH 4,2 либо физиологического раствора (хлорида натрия для инъекций BP 0,9% - AstraZeneca) затем добавляли к раствору и тщательно перемешивали. Затем раствор стерилизовали фильтрованием и разливали в дозе 1 мл при концентрации 1 мг/мл соединения 1.

Пример 16. Ветеринарное клиническое лечение незаживающих ран и ран, которые не поддаются действующим стандартам лечения

Соединение 1 применяли для лечения сложных ран у 10 домашних (т.е. находящихся в частной собственности и уходе) животных с целью улучшения вторичного заживления раны.

Семь собак (*Canis lupus familiaris*) и одного древесного кенгуру (*Dendrolagus lumholtzii*) с хроническими, незаживающими ранами, которые не поддавались действующим ветеринарным стандартам оказания медицинской помощи при таких случаях, лечили соединением 1 у независимых ветеринаров. Второго древесного кенгуру и новогвинейскую летучую лисицу (*Pteropus conspicillatus*) с ранами, непригодными для стартовой терапии согласно действующим стандартам оказания медицинской помощи, также лечили соединением 1. Все случаи представляли собой открытые раны без применения повязок или других средств перевязки во время курса лечения соединением 1 и последующего периода заживления раны. Если не указано иное в отдельных практических примерах, сопутствующего лечения в течение курса лечения соединением 1 не применяли.

Описание случая и лечения для каждого из этих пациентов приведены ниже. Следует обратить внимание, что появление на осмотр этих животных к лечащим ветеринарам часто было нерегулярным и факт заживления раны, возможно, происходил задолго до оценочных визитов.

Лечение соединением 1 привело к эффективному заживлению раны с минимальным рубцеванием в восьми завершенных случаях. Заживление раны хорошо проходило в двух продолжающихся практических примерах, которые были обработаны недавно (практические примеры 8 и 10).

Практические примеры 1-8. Незаживающие раны

Практический пример 1. Незаживающая глубокая некрозная рана на морде, 3-летний Бернский зенненхунд

Описание случая

- Большая овальная по форме рана 7 см длиной x 4 см шириной x до 2 см глубиной на морде с левой стороны от носа пациента.

- Рана была покрыта коркой с пятнами выделения некротических пустул.

- Гистопатология: глубокое повреждение, вызывающее некроз, возможно, связаное с укусом паука и характеризуется наличием кокковых бактерий и гнойного воспаления.

- Рана не поддавалась лечению стандартными протоколами лечения ран, включающими антибиотики (цефалексин, амоксиклав, гентамицин) и противовоспалительные средства (макролон) в течение 3 месяцев.

- Рана постепенно увеличивалась в размерах, что приводило к закрытию глаза и значительно влияло на зрение пациента и общее поведение. Нижнечелюстные лимфатические узлы пациента увеличивались.

- Оставшимся вариантом действующего стандарта лечения была агрессивная лицевая хирургия и реконструкция.

- Первоначальное лечение включало 5 нанесений (всего 5,3 мл) геля соединения 1 (3 мг/мл) в течение начального 14-дневного периода (соединение 1 применяли в дни 1, 2, 6, 10 и 14).

- После частичного заживления раны через 28 дней пациента обрабатывали одной дозой 1 мл соединения 1 (0,5 мг/мл) в виде инъекции точно под поверхностью в нескольких местах по всей площади раны.

- Через 35 дней после инъекции соединением 1 рана заполнялась здоровой грануляционной дифференцированной тканью и не оставалось никаких следов инфекции.

- Сопутствующими лекарственными препаратами на протяжении курса лечения соединением 1 были темгезик и лидокаин во время первой обработки гелевым составом, темгезик и трамадол в момент, и в день сразу же после введения инъекции (т.е. дни 28 и 29), а затем поддерживающая терапия низкой пероральной дозой кортикостероида (макролона) ежедневно с 42-го дня.

- Через 76 дней после последней обработки рана заживала и заполнялась нормальной тканью с минимальным рубцеванием, а также отрастанием шерсти, охватывающим более 95% от первоначальной площади раны.

Практический пример 2. Прободение, инфицированная абдоминальная киста, 13-летний боксер

Описание случая

- Хрупкий пациент с тяжелой формой остеоартрита с высоким риском обезболивания для любого хирургического вмешательства.

- Пациент имел неотступную инфицированную кисту на спине ближе к хвосту, которая не поддавалась лечению при регулярном дренаже и инъекциях в

кисту антибиотиков (гентамицин, энрофлоксацин, нороциллин) в течение 5 месяцев.

- Пациент с прободившейся кистой и повышенной температурой. Кисту очищали, чтобы удалить мертвую кожу, а затем промыли физиологическим раствором и хлоргексидином. Пациента подвергали лечению антибиотиками (клиндамицин и нороциллин) и противовоспалительными средствами (метакам).

- Через 5 дней рана, сопровождающаяся прободившейся кистой, не показала никаких признаков заживления и была окружена значительным местным воспалением. Открытую площадь раны (примерно 5 см длиной x 3 см шириной и до 2,5 см глубиной) затем промывали физиологическим раствором и наносили 0,5 мл геля соединения 1 (3 мг/мл) равномерно по всей площади раны.

- Через 5 дней после обработки гелем соединения 1 рана значительно сокращалась до менее чем 30% от площади исходной раны (примерные размеры 3 см длиной x 1,5 см шириной x 1 см глубиной) и состояла из здоровой грануляционной ткани.

- Через 30 дней рана зажила, демонстрируя нормальную ткань и более чем 70% отрастания шерсти от первоначальной площади раны.

- Сопутствующими лекарственными препаратами для этого пациента на протяжении курса лечения соединением 1 были инъекционные нестероидные противовоспалительные средства (метакам) в момент обработки.

Практический пример 3. Незаживающие инфицированные колотые раны, 11-летний чау-чау

Описание случая

- Пациент с двумя большими ранами после укуса (каждая примерно 4 см длиной x 1,5 см шириной x 2 см глубиной) в ягодичной области, полученными вследствии собачьей драки.

- Раны промывали и пациента подвергали лечению антибиотиками (таблетки амоксиклава и инъекции нороциллина).

- Через 8 дней раны были неотступными, не закрытыми и инфицированными.

- Раны очищали и 0,4 мл геля соединения 1 (3 мг/мл) равномерно наносили на каждую рану.

- Через 15 дней после обработки соединением 1 раны значительно сократились до менее чем 40% от их первоначального размера, образовав струпы и не было никаких признаков инфекции.

- Через 46 дней после обработки соединением 1 раны полностью зажили, демонстрируя нормальную ткань, отсутствие рубцевания и полное отрастание шерсти на площади раны.

- Сопутствующих лекарственных препаратов у этого пациента не было на протяжении лечения соединением 1.

Практический пример 4. Незаживающие инфицированные раны на морде и плюсне у собаки (11-летний боксер)

Описание случая

- Пациент с двумя участками незаживающих, инфицированных и воспаленных ран: один на морде с левой стороны и один на левой задней плюсне; которые не поддались на длительный 8-недельный курс антибиотиков (цефалексин, доксициклин) и кортикостероидов (макролон).

- Применяли одну обработку 5 мг/мл гелевого состава соединения 1 к ране на морде (0,4 мл) и к ране на лапе (0,6 мл).

- Рана на морде быстро поддавалась лечению соединением 1 с образованием небольшого струпа через 7 дней и полным закрытием раны,

включая значительное отрастание шерсти, очевидное через 14 дней после обработки. Площадь раны полностью зажила через 63 дня после обработки.

- Рана на лапе также быстро поддавалась лечению с образованием струпа на локализованных площадях. Через 14 дней струп в значительной степени сходил и наблюдали здоровую, лежащую в основе грануляционную ткань. Площадь раны полностью закрылась и имела больше чем 95% шерстяного покрова через 63 дня после обработки.

- Сопутствующими лекарственными препаратами для этого пациента на протяжении курса лечения соединением 1 был курс на постоянной ежедневной основе низких доз кортикостероидов (макролона) для лечения синдрома атопического дерматита у собаки.

Практический пример 5. Незаживающая инфицированная рана на ухе собаки (4-летний Бул Араб)

Описание случая

- Пациент с незаживающей рваной раной из-за несчастного случая на охоте, которая располагалась на левом ухе в течение более 6 недель.

- Три обработки, каждая по 0,1 мл 5 мг/мл гелевого состава соединения 1, применяли к пораженному участку с 8-дневными интервалами. Сопутствующих лекарственных препаратов на протяжение курса лечения пациента соединением 1 не применяли.

- Через 41 день после первой обработки соединением 1 рана полностью закрылась. Дополнительное обследование через 152 дня после начала лечения показало полное заживление раны, минимальное рубцевание с более чем 80% шерстяного покрова от первоначального участка раны.

Практический пример 6. Незаживающая инфицированная рана на ухе собаки (11-летний боксер)

Описание случая

- Пациента с незаживающей (инфицированной и воспаленной) язвой в верхней части левого уха подвергали лечению в течение 10 недель согласно протоколам действующего стандарта лечения, включающего регулярное применение (i) дерматологического состава для локального применения (Neotopic) в комбинации с антибактериальными (неомицина сульфат), противовоспалительными (гидрокортизон) и противозудными (лидокаин) средствами, и (ii) коммерческой суспензии (Auracol) с противовоспалительными (преднизолон), противогрибковыми (миконазола нитрат) и антибактериальными (сульфат полимиксина B) компонентами. До подвержения этих лечений пациент проходил продолжающийся курс малых доз пероральных кортикостероидов (макролона) для лечения синдрома хронического атопического дерматита собаки.

- После 10 недель лечения согласно протоколу действующего стандарта лечения не нблюдали никаких признаков заживления раны.

- Применяли одну обработку 3 мл 5 мг/мл гелевого состава соединения 1 к пораженному участку и через 15 минут после нанесения соединения 1 наблюдали заметное покраснение обработанного участка.

- Через 4 дня после обработки соединением 1 пациенту возобновляли ежедневную низкую дозу кортикостероидов (макролона) для лечения тяжелого атопического дерматита. Это лечение продолжалось на протяжении полного курса заживления раны.

- Через 17 дней после обработки соединением 1 не наблюдали никаких признаков инфекции или воспаления, и наблюдали развитие хорошо гранулированной ткани раны на обработанной площаде.

- Через 83 дня после обработки наблюдали полное закрытие раны и отрастание шерсти, произошедшее на более чем 90% от первоначальной площади раны.

- Через 139 дней после обработки не удавалось разглядеть участок первоначальной раны, не было никаких признаков рубцевания и/или различия в пигментации кожи, или выраженного уплотнения в и вокруг обработанной площади.

Практический пример 7. Незаживающие инфицированные раны на ушах и морде собаки (8-летний Джек Рассел терьер)

Описание случая

- Пациент с двумя незаживающими ранами на кончике и основании правого уха и с незаживающей раной на морде, которые владелец наблюдает в течение более чем 4 недели. Возможной причиной был укус зараженного паука или другого насекомого.

- Две обработки, каждая 0,1 мл 5 мг/мл гелевого состава соединения 1, применяли к обеим пораженным участкам на ушах с 5-дневным интервалом. Применяли одну обработку 0,1 мл 5 мг/мл гелевого состава соединения 1 к поражению на морде.

- Через 13 дней после первой обработки соединением 1 обе раны на ухе значительно сократились и сформировались струпы. Через 29 дней рана полностью закрылась и наблюдали полное отрастание покрова шерсти.

- Через 16 дней после обработки рана на морде полностью зажила.

- Сопутствующим лекарственным препаратом для этого пациента был 5-дневный курс перорального антибиотика амоксициллина и клавулановой кислоты (амоксиклав) в момент начала лечения.

Практический пример 8. Инфицированные раны кости на лапе древесного кенгуру (Сумчатые, *Dendrolagus lumholtzi*)

Описание случая

•Пациент, представляющий собой дикого древесного кенгуру, был ранен при атаке собаки, что привело к лакро-сакральному вывиху и остеомиелиту. Пациента подвергали лечению в течение 1 месяца инъекционными антибиотиками цефтазидимом (Фортум) и триметоприм сульфаметоксазолом (TMS). Воспаление уменьшалось, но бактериологический посев показал, что грамотрицательные бактерии и *Serratiamarcesens* по-прежнему присутствуют. Пораженная конечность не могла справляться с нагрузкой.

•Лечение цефтазидимом в течение дополнительных 2 недель не привело к улучшению состояния и ветеринар сообщил плохой прогноз по очистке инфекции из кости и вероятному значительному механическому разрушению костной структуры, что может задеть в будущем возможность передвигаться. Новый бактериологический посев брали из разгрузочных пазух скакательного сустава и лапы, который показал смешанные виды анаэробных и грамположительных видов *Actinomyces*, поэтому произвели одну медленную внутривенную инфузию йодида натрия (Sodide) .

•Из-за отсутствия реакции на другие виды лечения и общего плохого прогноза с данными стандартами лечения, начали спасательное лечение, включающее 4 обработки 5 мг/мл состава геля соединения 1, спустя 2 недели.

•При первом применении наносили 0,1 мл геля соединения 1 на каждое из трех поражений на правом скакательном суставе (одно над голеностопным суставом, одно под подушечкой лапы и небольшое поражение у основания трещины) и начинали вводить медленную внутривенную инфузию йодида натрия. Через 10 минут после нанесения геля соединения 1 наблюдали гнойное выделение из обрабатываемой области.

•На осмотре через 8 дней после первой обработки наблюдали гнойное выделение на 2 из 3 ран на лапы. Другая рана (наименьшее поражение на трещине) сократилась и начинала заживать. Дополнительное лечение 0,15 мл 5 мг/мл состава геля соединения 1 применяли для обработки каждой из двух открытых ран (одна над голеностопным суставом, другая у основания

подушечки лапы). Также вводили медленную внутривенную инфузию йодида натрия.

•Еще через 15 дней (23 день после первоначальной обработки) несколько мл густого гнойного содержимого отжимали из раны на подушке лапы перед форсированным нагнетанием 0,15 мл 5 мг/мл состава геля соединения 1 в осушенный синус раны.

• Через неделю отмечали значительное улучшение в прогнозе инфекции. Небольшой кусочек кости удаляли из отверстия в подушечке лапы. Не было признаков гноя, но наблюдали серозные выделения. Дополнительные 0,2 мл геля соединения 1 наносили на каждое из поражений, одно над лодыжкой, а другое под стопой. Также производили медленную внутривенную инфузию йодида натрия. Теперь конечность держала вес, но трещина и подушка лапы по-прежнему были уплотненными из-за воспаления и походка животного была очень неравномерной и предпочтение отдавалось в пользу неповрежденной задней ноги.

•Еще через 15 дней рана на голеностопном суставе полностью закрывалась и отростала шерсть. Рана в месте подушечки лапы закрылась до менее чем 50% от ее размера в предыдущем визите и окружающая кожа и ткани были мягкими, пластичными и в норме. Теперь конечность полностью несла вес и неравномерности в походке животного не наблюдали.

•Помимо инъекций йодида натрия, никакие другие сопутствующие лекарственные препараты не вводили пациенту в течение всего курса лечения соединением 1.

Практические примеры трудных ран, для которых не подходят действующие стандарты лечения

Практический пример 9. Инфекционные васкулиты в ухе древесного кенгуру (Сумчатые, *Dendrolagus lumholtzi*)

Описание случая

•Пациент представлял собой молодое потерпевшее животное, найденное в дикой природе.

•Пациент был очень слаб, обезвожен и с анемией. В образце мочи выявили кровь и бактериальную инфекцию, вероятно, сепсис. Пациента поместили на инфузионную терапию и начали лечение лекарственными препаратами против тошноты, маропитанта цитрат (серения), и двумя составами инъекционных антибиотиков Трибактерал (триметоприм, сульфадиазин) и цефтазидим (Фортум).

•Через 9 дней капельного введения жидкости состояние пациента улучшилось, но была травма правого уха и, вероятно, инфекционный васкулит и гангрена. Не было возможности провести хирургическое вмешательство из-за значительного риска при введении анестетика по причине тяжелых повреждений пациента. Вместо этого начали лечение составом геля соединения 1.

•Три обработки по 0,1 мл 5 мг/мл геля с соединением 1 в составе наносили на пораженный участок с 7-дневными интервалами. Сопутствующим лекарственным препаратом в течение этого времени был только цефалоспориновый антибиотик цефтазидим (Фортум).

•Через 7 дней после первой обработки гелем с соединением 1 плотно прилегаемый струп покрывал поверхность раны. Этот струп отошел через 10 дней и выявил хорошо развитую, розовую, грануляционную раневую поверхность.

•После нанесения третьей и последней обработки через 14 дней после первоначальной обработки площадь раны сократилась примерно на 50% и через 25 дней наблюдали здоровую ткань по всей площади раны.

•Через 67 дней поражение полностью зажило и наблюдали полное покрытие шерстью над ухом.

Практический пример 10. Тяжелая рваная рана на голове новогвинейской летучей лисицы (Млекопитающие, *Pteropus conspicillatus*)

Описание случая:

•Пациент 4-месячного возраста, летучая лисица, с глубоким проникающим ранением на голове 4-месячной летучей лисицы, вызванного в результате запутанности в колючей проволоке.

•По мнению лечащего ветеринара, который имел большой опыт в травмах животных дикой природы (включая летучих лисиц), оказать обычное стандартное лечение, вероятно, было весьма проблематичным, в результате чего правый глаз потеряет форму и не сможет закрываться, либо из-за образования чрезмерной ткани шрама, связанное с хирургическим вмешательством либо из-за степени грануляции, требуемой при применении повязки для заживления раны.

•Соединение 1 применяли на ранах в 3 нанесениях 0,1 мл 5 мг/мл состава геля в течение 28-дневного периода (дни 1, 10 и 28). Во время курса лечения не применяли другие сопутствующие лекарственные препараты или вмешательства.

•Через 14 дней после первоначальной обработки отмечали значительное заполнение и ремоделирование ткани и через 28 дней глаз смог полностью закрываться. Через 38 дней струп покрывал всю площадь раны и стал сходить на 49 день с выявлением хорошей гранулированной ткани.

•Через 55 дней после первоначального обработки наблюдали хорошее заполнение ткани по всей площади первоначальной раны и правый глаз вернулся в исходное положение. Наблюдали очень здоровую грануляционную ткань.

Пример 17. Заживление и косметический результат ран, полученных вследствие некроза и отторжения спонтанных опухолей у животных-компаньонов, обработанных соединением 1

Ветеринарные клинические данные о скорости заживления ран, которые сформировались вследствие некроза и отторжения спонтанных опухолей, которые были обработаны путем введения внутритуморальной инъекции соединения 1 (состав 30% 1,2 пропандиол при концентрации либо 0,5 или 1,0 мг/мл) у двадцати четырех домашних животных приведены в таблице 17.

Следует отметить, что все раны лечили как открытые раны и никакие средства перевязки, повязки, лосьоны или сопутствующие лекарственные препараты не применяли в любом из этих случаев.

Таблица 17. Размер раны и скорость заживления (время закрытия) у животных-компаньонов с последующим отторжением спонтанных опухолей, которые были обработаны инъекционным составом соединения 1.

Собака				
Класс размера раны	Количество случаев	Средняя площадь раны ($см^2$)	Средняя глубина раны (мм)	Среднее количество дней от опухолевого струпа до закрытия раны
0,25 to 9 $см^2$	7	3,6 ± 2,7	6,7 ± 2,8	24 ± 16
9 -50 $см^2$	5	30,4 ± 16,1	14,0 ± 5,5	40 ± 15
>50-130 $см^2$	3	95,3 ± 35,0	13,3 ± 5,8	62 ± 18
Лошадь				
Класс размера раны	Количество случаев	Средняя площадь раны ($см^2$)	Средняя глубина раны (мм)	Среднее количество дней от опухолевого струпа до закрытия раны
0,25 to 9 $см^2$	4	2,9 ± 1,4	7,5 ± 2,9	20 ± 12
9 -50 $см^2$	2	19,5 ± 14,5	10,0 ± 0	53 ± 22
Кошка				
Класс размера раны	Количество случаев	Средняя площадь раны ($см^2$)	Средняя глубина раны (мм)	Среднее количество дней от опухолевого струпа до закрытия раны
0,25-12 $см^2$	3	4,8 ± 6,3	5,0 ± 4,3	17 ± 10

Данные из этих примеров также показывают хорошие косметические результаты при заживлении раны с минимальными рубцеванием и нормальным ростом шерсти у большинства пациентов (таблица 18). В немногих случаях, когда рубцевание имело место, это обычно совпадало с участками, как правило, тонкой кожи (например, на конечностях лошадей и собак).

Таблица 18: Особенности ткани, кожи и шерсти участков излеченных ран у животных-компаньонов после отторжения спонтанных опухолей, которые были обработаны инъекционным составом соединения 1.

Особенности ткани, кожи и шерсти участка раны после заживления				
Особенности участка раны и категория результата		Количество собак	Количество лошадей	Количество кошек
Дефицит ткани в месте раны[1]	Нуль или минимальное	15	6	3
	Незначительный	0	0	0
	Существенный	0	0	0
Рубцевание и утолщение кожи[2]	Нуль или минимальное	13	4	3
	Незначительный	1	1	0
	Существенный	1	1	0
Возобновление роста волос на заживленной области[3]	Полное	12	5	2
	Частичное	1	1	1
	Редкое	2	0	0
Изменение цвета волос	Нет	15	3	2
	Да	0	3	1
Пигментация кожи	Нормальная	11	3	3
	Пятнистая	1	1	0
	Гипопигментация	3	1	0
	Гиперпигментация	0	1	0

[1] Категории дефицита ткани

Нуль или минимальное: <5% дефицита ткани от первоначальной площади раны

Незначительный: 5-10% дефицита ткани от первоначальной площади раны

Существенный: >10% дефицита ткани от первоначальной площади раны

[2.] Категории рубцевания и утолщения кожи:

Нуль или минимальное: Рубцевание не очевидно визуально или на ощупь

Незначительный: Локализованные покрытие шрамом <10% первоначальной площади раны

Существенный: Покрытие шрамом> 10% первоначальной площади раны

[3.] Категории отрастания волос на площади раны

Полное: Волосы покрывают> 95% первоначальной площади раны

Частичное: Волосы покрывают> 50% первоначальной площади раны

Редкое: Волосы покрывают<50% первоначальной площади раны

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ содействия заживлению раны у субъекта, включающий введение субъекту соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п. 1, где содействие заживлению раны включает увеличение скорости заживления раны.

3. Способ по п. 1, где содействие заживлению раны включает уменьшение рубцевания в ткани раны.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где содействие заживлению раны включает как увеличение скорости заживления раны, так и уменьшение рубцевания в ткани раны.

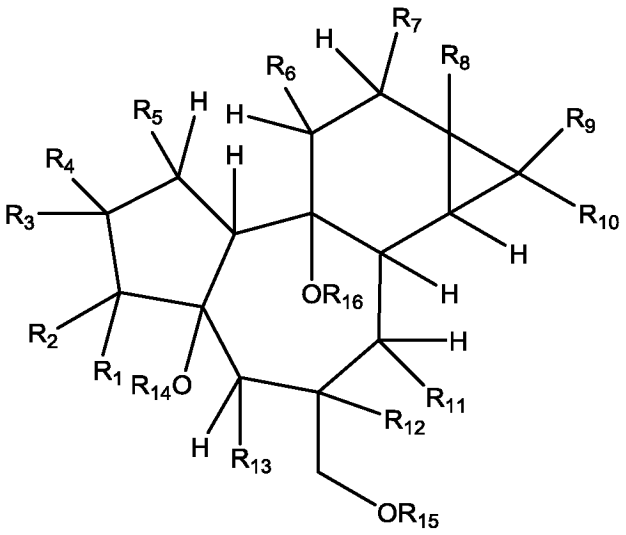
5. Способ по любому из пп. 1-4, где содействие заживлению раны включает улучшение косметического результата зажившей раны.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где рана представляет собой хроническую рану, острую рану или существующую рану.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где соединение эпокси-тиглиана представлено в форме растительного экстракта.

8. Способ по п. 7, где растительный экстракт можно получить из растения, которое представляет собой виды *Fontainea* или виды *Hylandia*.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где соединение эпокси-тиглиана представляет собой соединение формулы (I):



(I),

где

R_1 представляет собой водород, и R_2 представляет собой $-OR_{17}$; или R_1 и R_2 вместе образуют карбонильную группу (=O);

R_3 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R_4 и R_5 независимо представляют собой водород или $–OR_{17}$; или R_4 и R_5 вместе образуют двойную связь или эпоксид (-O-);

R_6 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R_7 представляет собой -OH или $-OR_{18}$;

R_8 представляет собой -OH или $–OR_{18}$; при условии, что R_7 и R_8 одновременно не являются OH;

R_9 и R_{10} независимо выбраны из водорода и C_{1-6}алкила;

R_{11} и R_{12} или R_{12} и R_{13} вместе образуют эпоксид, а оставшаяся группа R_{11} и R_{13} представляет собой водород, -OH или $–OR_{17}$;

R_{14} представляет собой водород или $–R_{17}$;

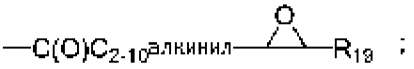
R_{15} представляет собой водород или $-R_{17}$;

R_{16} представляет собой водород или $-R_{17}$;

R_{17} представляет собой водород, $-C_{1-6}$алкил, $-C_{2-6}$алкенил, $-C_{2-6}$алкинил, $-C(O)C_{1-6}$алкил, $-C(O)C_{2-6}$алкенил или $-C(O)C_{2-6}$алкинил;

R_{18} представляет собой C_{1-20}алкил, $-C_{2-20}$алкенил, $-C_{2-20}$алкинил, $-C(O)C_{1-20}$алкил, $-C(O)C_{2-20}$алкенил, $-C(O)C_{2-20}$алкинил, -C(O)циклоалкил, $-C(O)C_{1-10}$алкилциклоалкил; $-C(O)C_{2-10}$алкенилциклоалкил, $-C(O)C_{2-10}$алкинилциклоалкил, -C(O)арил, $-C(O)C_{1-10}$алкиларил, $-C(O)C_{2-10}$алкениларил, $-C(O)C_{2-10}$алкиниларил, $-C(O)C_{1-10}$алкил$C(O)R_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкенил$C(O)R_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкинил$C(O)R_{19}$, $-C(O)C_{1-10}$алкил$CH(OR_{19})(OR_{19})$, $-C(O)C_{2-10}$алкенил$CH(OR_{19})(OR_{19})$, $-C(O)C_{2-10}$алкинил$CH(OR_{19})(OR_{19})$, $-C(O)C_{1-10}$алкилSR_{19}, $-C(O)C_{2-10}$алкенилSR_{19}, $-C(O)C_{2-10}$алкинилSR_{19}, $-C(O)C_{1-10}$алкил$C(O)OR_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкенил$C(O)OR_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкинил$C(O)OR_{19}$, $-C(O)C_{1-10}$алкил$C(O)SR_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкенил$C(O)SR_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$алкинил$C(O)SR_{19}$,

или



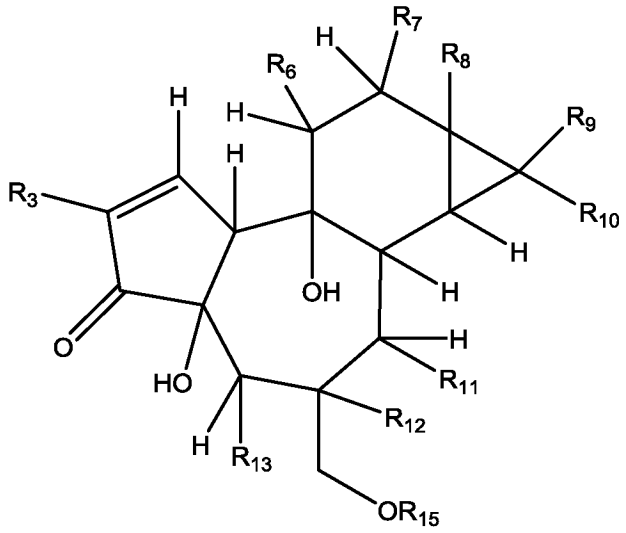
;

и

R_{19} представляет собой водород, $-C_{1-10}$алкил, $-C_{2-10}$алкенил, $-C_{2-10}$алкинил, циклоалкил или арил;

где каждая алкильная, алкенильная, алкинильная, циклоалкильная или арильная группа необязательно замещена; или его геометрический изомер, или стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль.

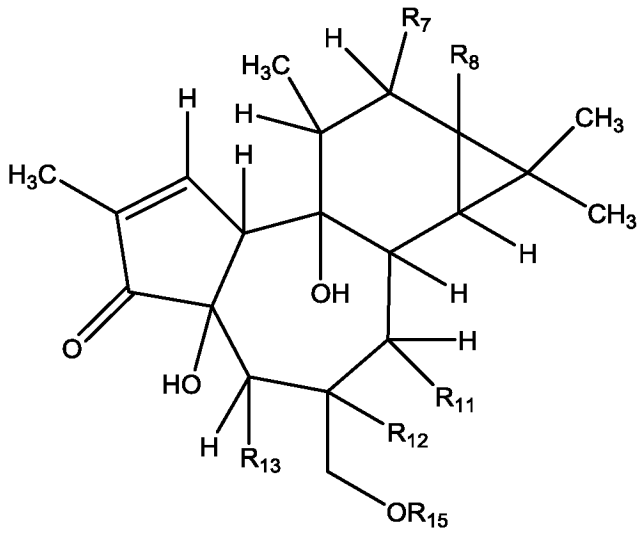
10. Способ по п. 9, где соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (II):



(II),

где R_3, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13} и R_{15} определены для формулы (I).

11. Способ по п. 9 или п. 10, где соединение формулы (I) или (II) представляет собой соединение формулы (III):



,

где R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, R_{13} и R_{15} определены для формулы (I).

12. Способ по любому из пп. 9-11, где R_1 представляет собой водород, и R_2 представляет собой OH или $–OC(O)C_{1-6}$алкил, $-OC(O)C_{2-6}$алкенил или $-OC(O)C_{2-6}$алкинил, или R_1 и R_2 вместе образуют карбонильную группу.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где R_3 представляет собой водород или $-C_{1-3}$алкил.

14. Способ по любому из пп. 9-13, где R_4 и R_5 независимо представляют собой водород или -OH, –OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил; или R_4 и R_5 вместе образуют двойную связь или эпоксид.

15. Способ по любому из пп. 9-14, где R_6 представляет собой водород или -C_{1-3}алкил.

16. Способ по любому из пп. 9-15, где R_7 представляет собой –OH, -OC(O)C_{1-15}алкил, -OC(O)C_{2-15}алкенил, -OC(O)C_{2-15}алкинил, -OC(O)арил, где арильная группа необязательно замещена, -OC(O)C_{1-15}алкиларил, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)H, -OC(O)C_{2-10}алкенилC(O)H, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-10}алкенилC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{1-10}алкилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{2-10}алкенилCH(OC_{1-3}алкил)(OC_{1-3}алкил), -OC(O)C_{1-10}алкилSC_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-10}алкенилSC_{1-6}алкил, -OC(O)C_{1-10}алкилC(O)OC_{1-6}алкил или -OC(O)C_{2-10}алкилC(O)OC_{1-6}алкил.

17. Способ по любому из пп. 9-16, где R_8 представляет собой –OC(O)C_{1-15}алкил, -OC(O)C_{2-15}алкенил, -OC(O)C_{2-15}алкинил или –C(O)арил, где арильная группа необязательно замещена.

18. Способ по любому из пп. 9-17, где R_9 и R_{10} независимо представляют собой -C_{1-3}алкил.

19. Способ по любому из пп. 9-18, где R_{11} и R_{12} образуют эпоксид, и R_{13} представляет собой -OH, -OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил.

20. Способ по любому из пп. 9-18, где R_{12} и R_{13} образуют эпоксид, и R_{11} представляет собой -OH, -OC(O)C_{1-6}алкил, -OC(O)C_{2-6}алкенил или –OC(O)C_{2-6}алкинил.

21. Способ по любому из пп. 9-20, где R_{15} представляет собой водород, -C(O)C_{1-6}алкил, -C(O)C_{2-6}алкенил или –C(O)C_{2-6}алкинил.

22. Способ по любому из пп. 8-21, где R_{14} представляет собой водород.

23. Способ по любому из пп. 9-22, где R_{16} представляет собой водород.

24. Способ лечения или предотвращения чрезмерного рубцевания, включающий применение по отношению к ране или рубцу соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли.

25. Способ по п. 24, где чрезмерное рубцевание представляет собой келоидный или гипертрофический рубец.

26. Применение соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для содействия заживлению раны у субъекта, или лечению, или предотвращению чрезмерного рубцевания.

27. Применение соединения эпокси-тиглиана или его фармацевтически приемлемой соли для содействия заживлению раны у субъекта, или лечению, или предотвращению чрезмерного рубцевания.

28. Соединение, выбранное из группы, включающей

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 5);

12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 6);

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 7);

12-бутаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 8);

12-[(2*E*,4*E*)-(6,6-диметоксигекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 9);

12-[(2*E*,4*E*)-6-оксогекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 10);

12-[(2*E*,4E)-6,7-дигидроксидодека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 11);

12-[(2*E*)-4,5-дигидрокси-дека-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 12);

12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 13);

12-[(2*E*)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 14);

12-(2-метилпроп-2-еноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 15);

12-[(2*E*,4*E*)-гекса-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 16);

12-[(2*E*,4*E*)-8-оксододека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 17);

12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 18);

13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 19);

12-[(2*E*)-бут-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 20);

12-тиглоил-13-бутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 21);

12-(3-бутеноил)-13-нонаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 22);

12-бензоил-13-(2-метилбутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 23);

12-[(2*Z*,4*E*)-дека-2,4-диеноил]-13-(2-метилпропаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 25);

12-[(2*E*,4*E*)-6,7-(анти)-эпокси-додека-2,4-диеноил]-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 26);

12,13-дибутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 27);

12-бензоил-13-бутаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 28);

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 29);

13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 30);

12-ацетил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 31);

12,13-ди-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 32);

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 33);

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 34);

12-тиглоил-13-(2-метилпропаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 35);

12-[(2*E*,4E)-3-метилтиопроп-2-еноил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 36);

12-{[2-(метилсульфанил)карбонил]-ацетоил}-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 39) и

12-[(2-метоксикарбонил)-ацетоил]-13-(2-метилбутаноил)-5,6-эпокси-4,7,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 40);

12,13-ди-ноноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 41);

12,13-ди-гексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 42);

12,13-ди-пентаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 43);

12,13-ди-тиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 44);

5,20-ди-ацетил-12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 45);

12,13-ди-(2*E*,4*E*)-гекс-2,4-еноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 46);

12-гексаноил-13-[2-(N-метилантранилоил)]-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 47);

12-ацетил-13-[2-(N-метилантранилоил)]-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 48);

12,13-ди-гептаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 49);

12-миристоил-13-ацетил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 50);

12-миристоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 51);

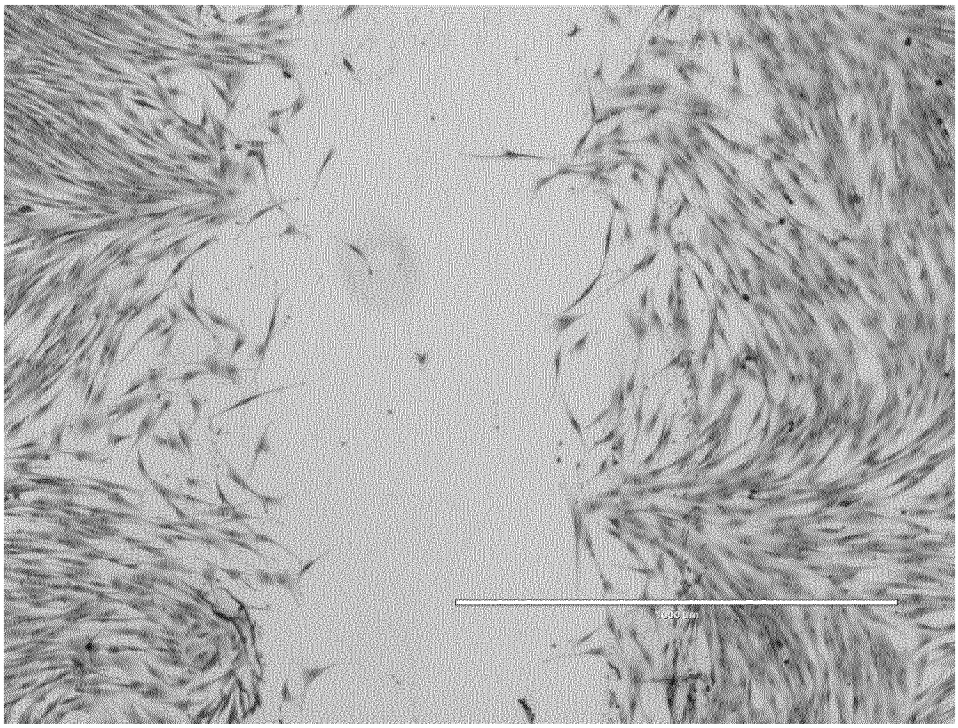
12-(2-метилбутаноил)-13-ацетил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 52) и

12-гидрокси-13-гексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 53);

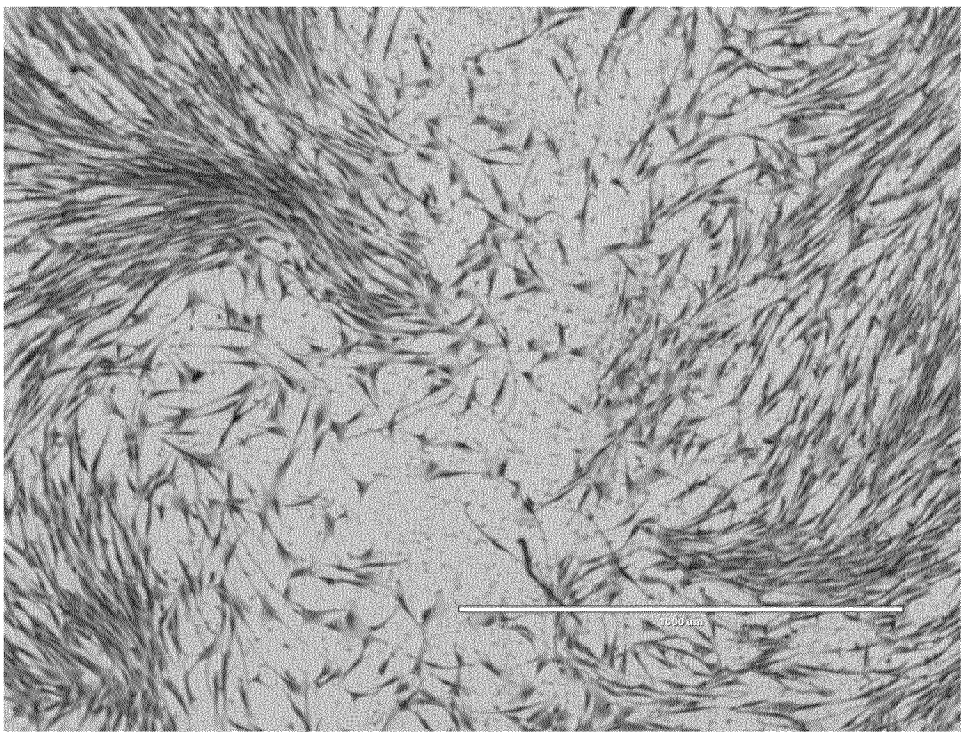
12,13-ди-(3-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиаен-3-он (соединение 60);

или их фармацевтически приемлемая соль.

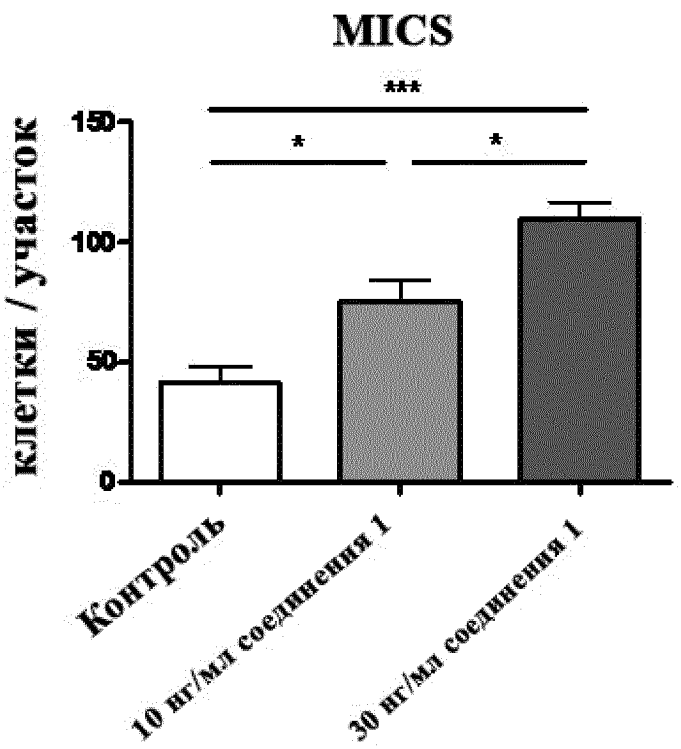
29. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 28 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.



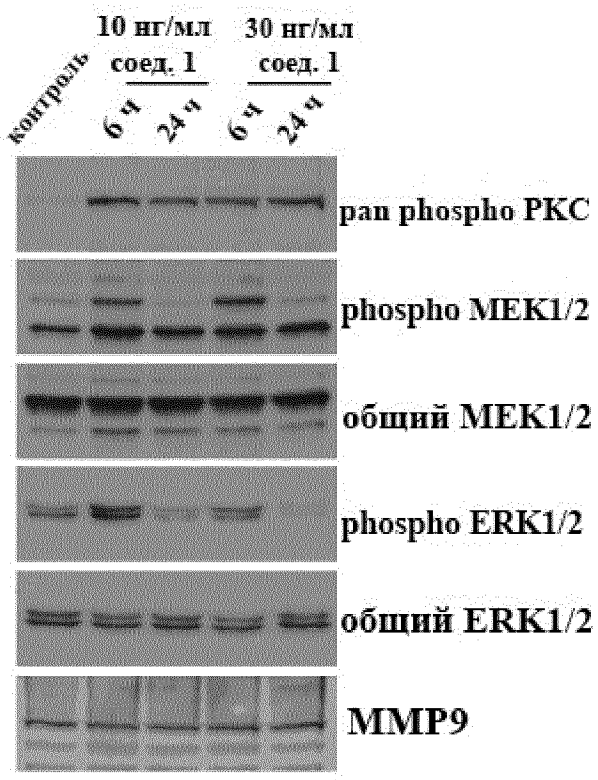
Фиг. 1



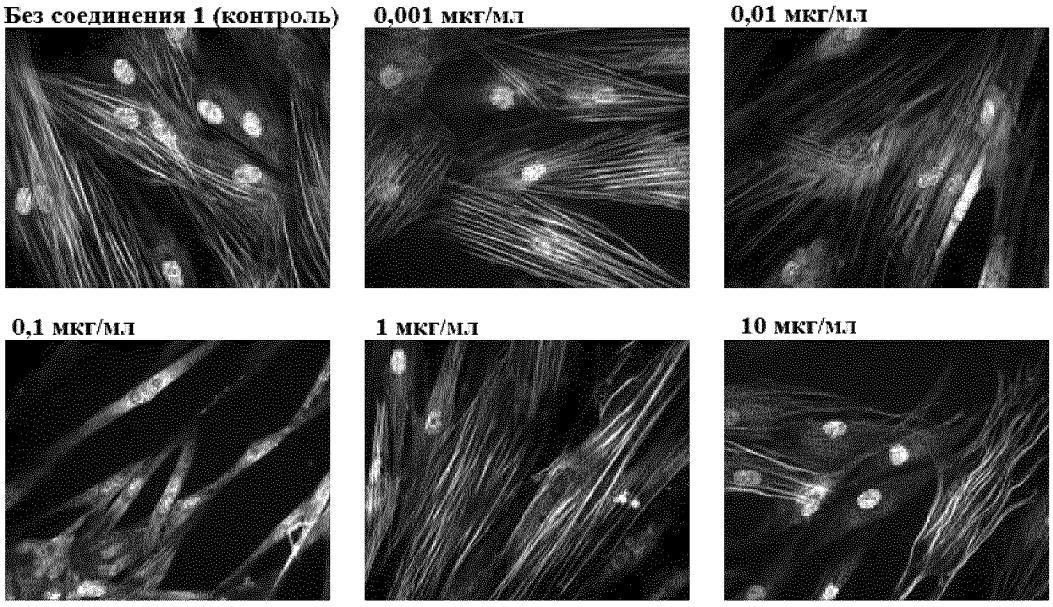
Фиг. 2


MICS
***
*
*
150
100
50
0
клетки / участок
Контроль
10 нг/мл соединения 1
30 нг/мл соединения 1

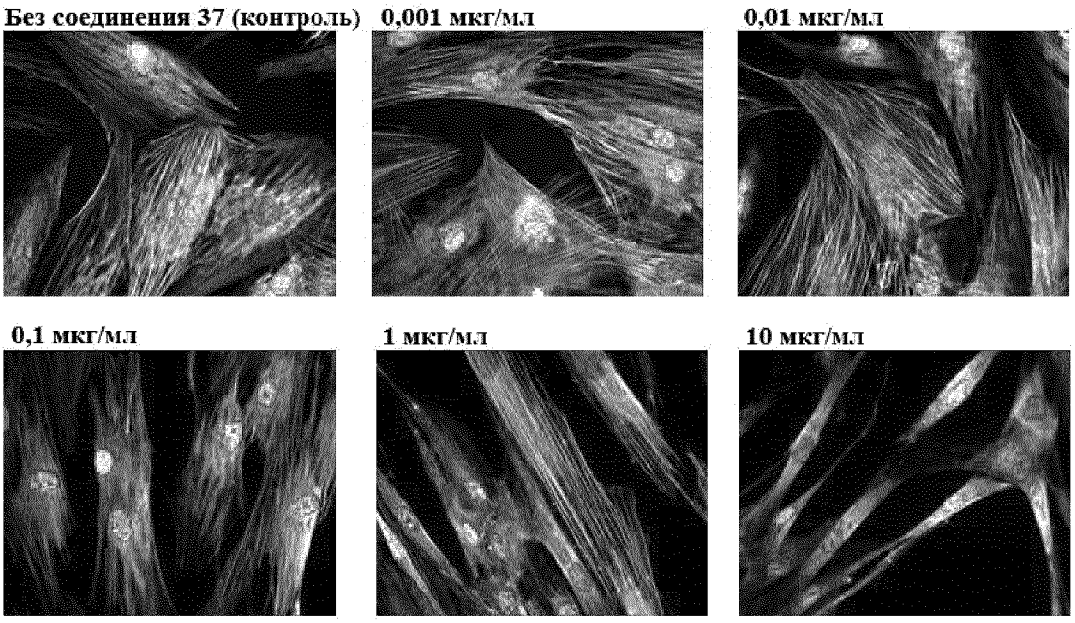
Фиг. 3


контроль
10 нг/мл соед. 1
30 нг/мл соед. 1
6 ч
24 ч
6 ч
24 ч
pan phospho PKC
phospho MEK1/2
общий MEK1/2
phospho ERK1/2
общий ERK1/2
MMP9

Фиг. 4


Без соединения 1 (контроль)
0,001 мкг/мл
0,01 мкг/мл
0,1 мкг/мл
1 мкг/мл
10 мкг/мл

Фиг. 5


Без соединения 37 (контроль)
0,001 мкг/мл
0,01 мкг/мл
0,1 мкг/мл
1 мкг/мл
10 мкг/мл

Фиг. 6