

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092749** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.23

(51) Int. Cl. *A61K 31/194* (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.02

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В
ПРЕДОТВРАЩЕНИИ И ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ**

(31) 102018000006725

(72) Изобретатель:
Джорджетти Паоло Лука Мария (IT)

(32) 2018.06.27

(33) IT

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(86) PCT/IB2019/052694

(87) WO 2020/003013 2020.01.02

(71) Заявитель:
**ПРОФЕШНЛ ДИЕТЕТИКС
ИНТЕРНЕШНЛ С.Р.Л. (IT)**

(57) Композиция для применения в предотвращении и/или лечении заболевания печени у млекопитающего, содержащая активный агент, где указанный активный агент содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

202092749
A1

202092749

A1

Композиции, содержащие аминокислоты, для применения в предотвращении и лечении заболеваний печени

Область, к которой относится изобретение

5 Настоящее описание в целом относится к композициям, содержащим аминокислоты. Более конкретно: описание относится к композициям, содержащим аминокислоты, для применения в предотвращении и/или лечении заболеваний печени.

Предпосылки изобретения

10 Заболевания печени относятся к наиболее часто встречающимся заболеваниям, вызываемым различными неблагоприятными условиями окружающей среды, такими как, например, паразиты и вирусы, наркотики, токсические вещества, алкоголизм и курение. Часто они представляют собой хронические заболевания с развивающимися или ухудшающимися
15 клиническими проявлениями. Хронические заболевания печени характеризуются постепенным разрушением паренхимы печени, которое сопровождается воспалительными реакциями, накоплением жира, фиброзным поражением и активацией трансформаций клеток, во многих случаях приводящих к развитию рака. Таким образом, заболевания печени
20 могут включать стеатоз, фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярную карциному в качестве прогрессирующих клинических поражений печени. Цирроз является результатом острого и хронического заболевания печени и характеризуется замещением ткани печени фиброзной рубцовой тканью и регенеративными узелками, что приводит к прогрессирующей утрате
25 печенью способности выполнять свои функции. Фиброз и узловая регенерация приводят к потере нормальной долевой микроскопической структуры печени. Фиброз представляет собой разрастание рубцовой ткани в результате, например, инфекции, воспаления, травмы и даже заживления. Со временем фиброзная рубцовая ткань медленно замещает нормальную
30 функциональную ткань печени, что приводит к уменьшению притока крови к печени, в результате чего печень не может полностью перерабатывать

питательные вещества, гормоны, лекарства и яды, которые находятся в кровотоке. Более распространенные причины развития цирроза включают алкоголизм, инфекции, вызванные вирусом гепатита С, попадание в организм токсинов и многие другие возможные причины. Как упоминается
5 далее, с эпидемиологической точки зрения наиболее характерным нарушением, приводящим к циррозу и, возможно, раку, является увеличение количества жира в организме и связанное с ним накопление жира в печени. Это накопление жира может быть вызвано двумя основными клиническими состояниями: злоупотреблением алкоголем и ожирением.

10 Чрезмерное и хроническое употребление алкоголя может вызвать алкогольную болезнь печени (АБП), серьезную проблему для здоровья, которая распространена в глобальном масштабе. Патологические признаки АБП развиваются в течение длительных периодов, включая стеатоз печени, стеатогепатит, цирроз – вплоть до рака.

15 Патогенное влияние этанола определяется множеством факторов. Ранние события, такие как повреждение митохондрий, генерация активных форм кислорода (АФК) и накопление жира, по-видимому, являются прямым результатом метаболизма этанола и являются общими признаками для АБП и неалкогольной жировой болезни печени или НАЖБП (см. далее) (Mantena
20 et al. 2008).

Механизмы клеточной защиты от вредного воздействия алкоголя ещё не до конца понятны. Было высказано предположение, что аутофагия, являющаяся важным способом клеточной деградации, при которой
25 клеточные белки и органеллы перевариваются для получения энергии или устранения поврежденных клеточных структур, играет роль в развитии АБП, хотя понимание этих механизмов все еще фрагментарно (Lin et al. 2015). Аутофагия, по-видимому, выполняет важнейшие функции как в гепатоцитах, так и в непаренхимальных клетках (т.е. макрофагах и
стволовых клетках печени), влияя на чувствительность к инсулину,
30 накопление липидов, гепатоцеллюлярные повреждения и врожденный иммунный ответ.

Недавние исследования на мышиныз и клеточных моделях показали, что прием ударных доз этанола активирует аутофагию в печени (Ding et al. 2010; Ni et al. 2013; Lin et al. 2013).

5 Хроническая интоксикация этанолом, по-видимому, напротив подавляет аутофагию печени (Thomes et al. 2015; Cho et al. 2014). Было показано, что ингибирование аутофагии у мышей усиливает стеатоз и повреждения в печени, вызванные этанолом, (Ding et al. 2010; Ni et al. 2013; Lin et al. 2013).

И наоборот, фармакологическое стимулирование аутофагии, по-
10 видимому, уменьшает проявления стеатоза и повреждений печени, вызванных этанолом (Lin et al. 2013). Таким образом, аутофагия рассматривается как защитный механизм против цитотоксических эффектов этанола, и стала новой мишенью для разработки терапевтических средств для лечения АПБ.

15 Как упоминалось ранее, второй по распространенности причиной нарушения функции печени является ожирение, часто встречающееся в развитых странах, и растущее с характером эпидемии также в развивающихся странах; ожирение вызывает так называемую неалкогольную жировую болезнь печени или НАЖБП. Развитие
20 стеатогепатита, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы становится все более распространенным в мире явлением. Биохимические и молекулярные механизмы, участвующие в развитии этих заболеваний, соответствуют тем, которые обычно описываются при АБП.

Поскольку измененный метаболизм аминокислот является важным
25 признаком заболеваний печени, связанных как с употреблением алкоголя, так и с развитием ожирения, и, в частности, характеризуется пониженными уровнями циркулирующих аминокислот с разветвленной цепью (BCAA) (Charlton, 2006), растет интерес к разработкам новых терапевтических подходов, основанных на применении аминокислотных добавок в качестве
30 терапии заболеваний печени.

Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение новых композиций на основе аминокислот, эффективных для профилактики и лечения заболеваний печени.

5 Согласно настоящему изобретению указанная цель достигается за счет решения, охарактеризованного в следующей далее формуле изобретения, которую следует воспринимать как часть настоящего раскрытия.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения обеспечивает композицию для применения в лечении заболевания печени у млекопитающего, причем композиция содержит активный агент, где 10 указанный активный агент содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

В одном или более вариантах осуществления активный агент композиции содержит дополнительно одну или более аминокислот, 15 выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

В предпочтительном варианте, данное изобретение используется при терапии следующих заболеваний печени: алкогольной 20 болезни печени (АБП), неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), липодистрофии, гепатита, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения обеспечивает способ лечения заболеваний печени у млекопитающих, включающий выбор композиции, содержащей активный агент, где активный 25 агент содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту; введение указанной композиции для лечения заболеваний печени у млекопитающих.

Далее изобретение будет описано только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры, где:

5 - На Фиг. 1 показана экспрессия генов, показанная в виде уровней мРНК в клетках HerG2, которые в течение 9 дней обрабатывали различными композициями на основе аминокислот и этанолом (EtOH) (* значение $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$ по сравнению с контрольными клетками).

10 - На Фиг. 2 показан уровень белка р62 в клетках HerG2, которые в течение 9 дней обрабатывали различными композициями на основе аминокислот и EtOH (* значение $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$ по сравнению с контрольными клетками; значение $\#P < 0,05$ по сравнению с обработанными EtOH клетками).

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

15 В нижеследующем описании приведены многочисленные конкретные детали для полного понимания вариантов осуществления изобретения. Варианты осуществления могут быть реализованы без одной или нескольких конкретных деталей или с другими способами, компонентами, материалами и т. д. В других случаях хорошо известные конструкции, материалы или операции не показаны и не описаны подробно, чтобы избежать усложнения в понимании аспектов этих вариантов осуществления изобретения.

25 Встречающиеся в этом описании указания на «один вариант осуществления» или «вариант осуществления изобретения» означают, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с этим вариантом осуществления изобретения, включены по меньшей мере в один вариант осуществления изобретения. Таким образом, появление выражений «в одном варианте осуществления» или «в варианте осуществления» в этом описании не обязательно все относятся к одному и тому же варианту. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления изобретения. Заголовки,

представленные в данном документе, предназначены только для удобства и не влияют на объем или значение вариантов осуществления изобретения.

Алкогольная болезнь печени (АБП), а также неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) являются серьезной глобальной проблемой здравоохранения; эти болезни характеризуются патологическими признаками, развивающимися в течение длительных периодов, включая стеатоз печени, стеатогепатит, цирроз, вплоть до рака.

Ранние события патогенеза, вызванного этанолом, например, повреждение митохондрий, образование активных форм кислорода (АФК) и накопление жира, являются общими признаками АБП и НАЖБП.

Кроме того, было обнаружено, что отличительным признаком заболевания печени является измененный метаболизм аминокислот, характеризующегося низким уровнем циркулирующих аминокислот с разветвленной цепью (ВСАА), а прием дополнительных аминокислот ВСАА, по-видимому, ассоциирован со снижением частоты осложнений при циррозе, когда его прописывают в качестве поддерживающей терапии (Charlton 2006).

Автор настоящей заявки обнаружил, что за счет добавления определенных карбоновых кислот в композицию, содержащую комбинацию лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина, может быть достигнута высокая эффективность противодействия заболеваниям печени, таким как, например, АБП и НАЖБП.

Было обнаружено, что описанная здесь композиция, содержащая в качестве активного агента аминокислоты лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин в сочетании с тремя карбоновыми кислотами, которые являются субстратами цикла трикарбоновых кислот, включая лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту в определенных количествах, восстанавливает измененный воздействием этанола метаболизм аминокислот, и, следовательно, предотвращает аутофагию. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), также называемый циклом Кребса и цитратным циклом, который осуществляется в матриксе митохондрий,

является второй стадией клеточного дыхания – трехстадийного процесса, за счет которого живые клетки разрушают являющиеся источником энергии органические молекулы в присутствии кислорода, чтобы получить энергию, необходимую им для роста и деления.

5 Композиции, содержащие указанный выше активный агент, а также композиции, содержащие указанный выше активный агент, включающий дополнительные определенные аминокислоты (перечисленные ниже в таблице 1) намного более эффективны, чем подобная аминокислотная композиция, не содержащая таких определенных
10 карбоновых кислот.

В одном или более вариантах осуществления изобретения в раскрытой здесь композиции массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты и общим количеством аминокислот лейцина, изолейцина, валина, треонина,
15 лизина составляет от 0,05 до 0,3, предпочтительно, от 0,1 до 0,25.

В одном или более вариантах осуществления активный агент может дополнительно содержать одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

20 В одном или более вариантах осуществления карбоновые кислоты, содержащиеся в композиции, состоят из лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты.

В другом варианте осуществления активный агент раскрытой здесь композиции может также включать аспарагиновую кислоту и/или орнитин L-альфа кетоглутарат (ОКГ).
25

Согласно одному из вариантов осуществления композиция содержит активный агент, состоящий из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и, опционально, тирозина, а также лимонной кислоты, янтарной
30 кислоты, и яблочной кислоты, причем указанные аминокислоты являются единственными аминокислотами, содержащимися в композиции. Лимонная

кислота, янтарная кислота и яблочная кислота могут быть единственными карбоновыми кислотами, содержащимися в композиции.

В другом варианте осуществления изобретения композиция может содержать аминокислоты изолейцин, лейцин и валин в количестве от 5 35% до 65%, предпочтительно, от 42% до 56% по массе по отношению к общей массе активного агента.

В одном или более вариантах осуществления массовое соотношение между лейцином и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно от 2,50 до 3,50.

10 В другом варианте осуществления масса или молярное количество лимонной кислоты выше, чем масса или молярное количество каждой из яблочной кислоты и янтарной кислоты. В предпочтительном варианте масса или общее молярное количество лимонной кислоты выше, чем масса или совокупное общее количество яблочной кислоты и янтарной 15 кислоты. В другом варианте осуществления массовое соотношение между лимонной кислотой и суммой яблочной кислоты и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно, от 1,5 до 2,5. В предпочтительном варианте массовое соотношение: лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно от 7:1:1 до 1,5:1:1; более предпочтительно, от 5:1:1 до 3:1:1. В наиболее 20 предпочтительном варианте осуществления изобретения массовое соотношение: лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет 4:1:1.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия предпочтительное молярное соотношение изолейцин:лейцин 25 находится в диапазоне 0,2-0,7, предпочтительно в диапазоне 0,30-0,60, и/или предпочтительное массовое соотношение валин:лейцин находится в диапазоне 0,2-0,70, предпочтительно, в диапазоне 0,30-0,65.

В другом варианте осуществления молярное соотношение треонин:лейцин находится в диапазоне 0,10-0,90, предпочтительно, в 30

диапазоне 0,20-0,70, и/или массовое соотношение лизин:лейцин находится в диапазоне 0,20-1,00, предпочтительно, в диапазоне 0,40-0,90.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения отношение между общим молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана должно быть выше 1,35.

В одном или более вариантах осуществления массовое соотношение между суммой лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и суммой аминокислот с разветвленной цепью – лейцина, изолейцина, валина – составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно, от 0,15 до 0,35.

В другом варианте осуществления совокупное массовое количество аминокислот с разветвленной цепью – лейцина, изолейцина, валина – плюс треонин и лизин выше, чем совокупное массовое количество трех карбоновых кислот, таких как лимонная кислота, яблочная кислота и янтарная кислота. В предпочтительном варианте массовое количество отдельной карбоновой кислоты (лимонной кислоты, янтарной кислоты или яблочной кислоты) меньше массового количества каждой отдельной аминокислоты: лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина.

В другом варианте осуществления изобретения совокупное молярное количество лизина и треонина выше, чем совокупное молярное количество трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты. Предпочтительное соотношение между совокупным молярным количеством трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты и совокупным молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,1 до 0,7, предпочтительно, от 0,15 до 0,55.

В одном или более вариантах осуществления раскрытая здесь композиция дополнительно содержит витамины, предпочтительно выбранные из группы витаминов В, такие как витамин В1 и/или витамин В6.

В ещё одном варианте осуществления настоящего изобретения описанная композиция может включать углеводы, добавки и/или вкусоароматические вещества.

5 В предпочтительном варианте осуществления композиция предназначена для предотвращения и/или лечения заболеваний печени, выбранных из группы, состоящей из жировой болезни печени, липодистрофии, гепатита, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

В одном или более вариантах осуществления болезнь печени представляет собой жировую болезнь печени. Жировая болезнь печени 10 может быть вызвана употреблением алкоголя (алкогольная жировая болезнь печени, АБД).

В одном или более вариантах осуществления жировая болезнь печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП).

15 В одном или нескольких вариантах осуществления жировая болезнь печени может быть вызвана лекарственными средствами или токсинами, такими как, например, амиодарон, метотрексат, дилтиазем, средствами высокоактивной антиретровирусной терапии, глюкокортикоиды, тамоксифен, грибные токсины.

20 Кроме того, в частности, при приготовлении композиций в соответствии с настоящим раскрытием и, в частности, при приготовлении активного агента, предпочтительно избегать аминокислоты аргинина. Другими аминокислотами, которых предпочтительно избегать при 25 приготовлении описанной здесь композиции, могут быть серин, пролин, аланин. Такие аминокислоты могут быть контрпродуктивными или даже вредными в некоторых концентрациях или стехиометрических соотношениях в композиции.

Аминокислоты, раскрытые в настоящей заявке, могут быть 30 заменены соответствующими фармацевтически приемлемыми производными, а именно солями.

Как станет ясно далее, применение композиций согласно настоящему изобретению особенно эффективно для предотвращения и/или лечения заболеваний печени.

5 В предпочтительном варианте осуществления изобретения описанные композиции можно применять в лечении алкогольной болезни печени (АБП).

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения аминокислотные композиции могут включать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, например, белки, витамины, углеводы,
10 натуральные и искусственные подсластители и/или вкусоароматические вещества. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут состоять из сывороточных белков, мальтодекстринов, фруктозы, казеината кальция, рыбьего жира, сукралозы, эфиров сахарозы, витамина D3, витаминов группы В.

15 Для перорального применения композиции согласно описанию могут быть в форме таблеток, капсул, гранул, геля, желатинизированного порошка или порошка.

Дополнительные уточнения в отношении количеств и соотношений между различными аминокислотами для включения в
20 композиции содержатся в прилагаемой формуле изобретения, которая является частью технического описания, представленного здесь в отношении изобретения.

ПРИМЕРЫ

В таблице 1 показаны две различные композиции на основе аминокислот, испытанные *in vitro* на гепатоцитах (клетки HepG2) и *in vivo* на
25 крысах, потребляющих этанол, как описано ниже.

Композиция, названная «BCAAем», включает активный агент, содержащий аминокислоты лейцин, лизин, изолейцин, валин, треонин, цистеин, гистидин, фенилаланин, метионин, тирозин, триптофан.

Композиция под названием «альфа 5m ($\alpha 5m$)» включает активный агент, содержащий те же аминокислоты, плюс лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту.

Таблица 1

Композиции (% w/w)	BCAAem	$\alpha 5m$
L-лейцин	30,01	31,0885
L-лизин HCl гидрохлорид	19,58	16,903
L-изолейцин	15	10,3628
L-валин	15	10,3628
L-треонин	8,4	7,254
L-цистеин	3,6	3,1089
L-гистидин	3,6	3,1089
L-фенилаланин	2,4	2,0726
L-метионин	1,2	1,0363
L-тирозин	0,72	0,6218
L-триптофан	0,48	2,0726
ОКГ (орнитин L- α кетоглутарат)	-	-
Витамин B1 (тиамина гидрохлорид)	-	0,004
Витамин B6 (пиридоксина гидрохлорид)	-	0,0038
Лимонная кислота безводная	-	8,0000
Яблочная кислота	-	2,0000
L-аспарагиновая кислота	-	-
Янтарная кислота	-	2,0000
Соотношение лейцин:изолейцин:валин	2:1:1	3:1:1

5

Композиции из приведенной выше Таблицы 1 могут быть приготовлены путем просеивания сначала всех компонентов через сито

размером 0,8 меш. Чтобы получить предварительную смесь каждый ингредиент (в количестве < 10% от совокупной массы) помещают в полиэтиленовый мешок вместе с порцией L-лизина HCl с получением 10% от массы всей композиции. Затем мешок вручную встряхивают в течение 5 минут. После этого предварительную смесь загружают в миксер (Planetaria) вместе с остальными ингредиентами и перемешивают в течение 15 минут при 120 об/мин с получением конечной гомогенной композиции.

МЕТОДЫ

Животные и варианты лечения

10 Протокол эксперимента был одобрен и проведен в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609 / ЕЭС) и требованиями Министерства Здравоохранения Италии и соответствовал Национальному Руководству по защите Животных.

15 Самцов крыс линии Wistar (возрастом 3 месяца) из лаборатории Charles River (Калько, Комо, Италия) использовали для проведения экспериментального анализа, описанного ниже.

Животных содержали отдельно в чистых полипропиленовых клетках и разделили на шесть групп:

20 1) группа, получающая такое же питание (контрольная группа по питанию, n = 6); животные получали контрольный жидкий рацион, в которой этанол (EtOH) был заменен изокалорийным мальтодекстрином;

2) группа, получавшая EtOH (группа EtOH, n = 7) получала жидкий рацион Либера-ДеКарли, включающий EtOH без ограничений [количество EtOH постепенно увеличивалось, достигая через 1 неделю 36% от потребляемой калорийности, что соответствует конечной концентрации 6,2% (об./об.)];

25 3) группа ВСААем (ВСААем, n = 6), животные в которой получали контрольный жидкий рацион, в котором EtOH был заменен изокалорийным мальтодекстрином, дополненный композицией аминокислот с разветвленной цепью («ВСААем» в таблице 1); норма получения этой

30

композиции – 1,5 г на килограмм веса животного в сутки (1,5 г/кг/сутки ВСААем);

4) группа альфа 5 ($\alpha 5m$, $n = 6$), получавшая контрольный жидкий рацион, в котором EtOH был заменен изокалорийным мальтодекстрином, дополненный композицией аминокислот (“ $\alpha 5m$ ” в таблице 1) в количестве 1,5 г /кг/сутки;

5) группа EtOH плюс ВСААем (EtOH + ВСААем, $n = 7$), получавшая жидкую диету Либера-ДеКарли, содержащую EtOH и композицию ВСААем ad libitum; и

10 6) группа EtOH плюс $\alpha 5m$ (EtOH + $\alpha 5m$, $n = 7$), в которой животные получали жидкую диету Либера-ДеКарли, содержащую EtOH и композицию $\alpha 5m$ ad libitum.

Подготовка образцов

15 Печень ($n = 4$ животных/группа) взвешивали, гомогенизировали в холодном водном растворе метанола (метанол:вода (об./об.) = 1:1) и экстрагировали согласно Want et al. (Want et al. 2013). Высушенные в вакууме образцы суспендировали в 120 мкл/на 50 мг ткани метанола:1 мМ тридекафторгептановой кислоты (ТДФНА) в соотношении 1:1 и центрифугировали при 16000 g в течение 10 минут при 4° С. Два мкл сурнатанта непосредственно загружали в масс-спектрометр УВЭЖХ (ультра высокоэффективная жидкостная хроматография) и анализировали как описано ниже. Для каждого образца были выполнены четыре технических повтора с использованием трех разных методов.

25 Хроматография и количественное определение аминокислот в печени

Стандартные аминокислоты были приобретены у компании Sigma (Милан, Италия). Стоковые водные растворы каждой аминокислоты готовили с концентрацией 1 мг/мл, разбавляли до конечной концентрации 3 пмоль/мкл и напрямую вводили шприцем со скоростью 10 мкл/мин в масс-спектрометр TripleTOF 5600+ (AB Sciex, Милан, Италия). Таким образом,

потенциал декластеризации (ПД) и энергия соударений (ЭС) были оптимизированы для каждой аминокислоты.

Затем готовили три смеси аминокислот на основе значений ПД и ЭС: СМЕСЬ 1, содержащую треонин, аспарагин, тирозин и серин, которую исследовали при ПД = 30 В, ЭС = 15 В; СМЕСЬ 2, содержащая глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, гистидин, метионин, аспарагиновую кислоту, глутамин и фенилаланин, которую исследовали при ПД = 40 В, ЭС = 15 В; и СМЕСЬ 3, содержащую глутаминовую кислоту, лизин, аргинин и триптофан, которую исследовали при ПД = 80 В, ЭС = 18 В.

Параметры источника были следующими: газ 1: 33 фунтов на квадратный дюйм, газ 2: 58 фунтов на квадратный дюйм, газовая завеса: 25 фунтов на квадратный дюйм, температура: 500° С и ISVF (плавающее напряжение ионного распыления): 5500 В.

Для получения калибровочных кривых в масс-спектрометр вводили четыре технических повтора трех смесей в различных количествах (10, 33, 50, 100, 200, 400 пмоль) после УВЭЖХ-разделения с использованием UPLC 1290 (Agilent Technologies, Италия, Cernusco sul Naviglio, Милан, Италия). Использовали хроматографическую колонку Waters, Acquity HSS T3 C18 2,1 x 100 мм, 1,7 мкм, а в качестве подвижной фазы использовали: А: 1 мМ TDFHA (тридекафторгептановой кислоты) в воде; В: 1 мМ TDFHA в ацетонитриле. Как описано (Le et al., 2014), для разделения всех аминокислот использовали градиент В от 12,5% до 26,5% в течение 4 минут с последующим увеличением от 26,5% до 92% за 3,5 мин при интенсивности подачи 0,35 мл/мин и температуре колонки 65° С.

Температура автоматического пробоотборника была установлена на 4° С. Калибровочные кривые строили с использованием площадей хроматографических пиков и взвешенной регрессии ($1/x$ для всех соединений, кроме аспарагина, тирозина, валина и глутаминовой кислоты, которые аппроксимировали по $1/x^2$) с помощью программного обеспечения MultiQuant версии 2.1 (SCIEX). Количественные значения для каждой

аминокислоты (пмоль) в образцах печени крыс получали путем соотношения площадей хроматографических пиков с площадями внешних калибровочных стандартов, после чего полученные нормировали по ткани (мг).

Культивирование и обработка клеток

5 Человеческие клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 были приобретены в Американской коллекции типовых культур (HB-8065; ATCC, Манассас, Виргиния). Клетки культивировали обычным образом в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) в атмосфере с 5%
10 CO₂ при 37° С. По два миллиона клеток HepG2 высевали в культуральные 75 см² флаконы (Corning Inc., Корнинг, Нью-Йорк).

Через шесть часов после посева добавляли 75 мМ (0,34%) EtOH и 1% ВСААем или α5m, по отдельности или в комбинации. В качестве контроля высевали необработанные клетки. Каждые 24 часа среду заменяли,
15 как в обработанных, так и в контрольных флаконах свежей средой с или без EtOH и ВСААем или α5m, соответственно. Через четыре дня после посева клетки трипсинизировали и высевали в новые флаконы: по 2 миллиона жизнеспособных клеток на флакон, с ежедневной заменой среды, как описано ранее (Pochareddy et al. 2012). Через пять дней после этого (всего
20 клетки культивировали в течение 9 дней с обработкой EtOH, ВСААем или α5m, или EtOH плюс ВСААем или α5m,) клетки собирали, как указано ниже, для проведения различных анализов.

Количественный анализ ПЦР-РВ

Количественные реакции ПЦР-РВ выполняли, как описано
25 (Tedesco et al. 2008); их проводили с использованием iQ SybrGreenI SuperMix (Bio-Rad; Сеграте, Италия) на ПЦР-амплификаторе для детекции результатов в реальном времени iCycler iQ (Bio-Rad).

Вкратце: РНК выделяли из ткани с использованием набора RNeasy® Tissue Mini Kit (Qiagen, Милан, Италия). кДНК синтезировали с
30 использованием набора для синтеза кДНК iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Сеграте, Италия).

Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Beacon Designer 2.6 от компании Premier Biosoft International (последовательности представлены в таблице 2 ниже). Номер цикла, при котором различные транскрипты поддавались детектированию (пороговый цикл, CT), сравнивали с номером для TBP, обозначаемым как Δ CT. Относительные уровни экспрессии генов выражали как 2-($\Delta\Delta$ CT), где $\Delta\Delta$ CT равно Δ CT крысы, получавшей EtOH, BCAAem или смесь САА (или обработанных клеток НерG2), минус Δ CT контрольной крысы (или необработанных клеток НерG2).

10

Таблица 2

Ген	Праймер	Последовательность	SEQ ID.	Ta
PGC-1 α	Sense 5'-3'	5'-GACCCCAGAGTCACCAAATGAC-3'	No.1	60
	Antisense 5'-3'	5'-TTGGTTGGCTTTATGAGGAGGA-3'	No.2	
Tfam	Sense 5'-3'	5'-AGATTGGGGTCGGGTCAC-3'	No.3	60
	Antisense 5'-3'	5'-GACAACCTGCCAAGACAGATG -3'	No.4	
NRF1	Sense 5'-3'	5'-ACTCGTGTGGGACAGCAAGC-3'	No.5	60
	Antisense 5'-3'	5'-ATGGTGAGAGGCGGCAGTTC-3'	No.6	
Cytc	Sense 5'-3'	5'-CGTTGTGCCAGCGACTAAAAA-3'	No.7	60
	Antisense 5'-3'	5'-TTCCGCCCAAAGAGACCA-3'	No.8	
TBP	Sense 5'-3'	5'-AGGCACCACAGCTCTTCCAC-3'	No.9	60
	Antisense 5'-3'	5'-CCCAGAACTCTCCGAAGCTG-3'	No.10	

Ta температура отжига ($^{\circ}$ C); номер доступа PGC-1 α : NM_013261; номер доступа Tfam: NM_009360.4; номер доступа NRF1: NM_005011; номер доступа Cytc: JF919224.1; номер доступа TBP: NG_051572 использовали для нормировке данных по экспрессии генов.

15

Вестерн-блоттинг

Белковые экстракты получали из печени с помощью реагента для экстракции белка млекопитающих T-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, ThermoScientific, Рокфорд, США), как описано производителем, в присутствии коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma Aldrich, Милан, Италия). Количество белка измеряли с помощью анализа с бидинхониновой кислотой (BCA, Pierce, Euroclone, Милан,

20

Италия); 50 мкг белков подвергали гель-электрофорезу в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях. Затем разделенные белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, Сеграте, Италия). Представляющие интерес белки выявляли с помощью специфических антител: анти-p62 и анти- α -актина (все из Cell Signaling, Euroclone, Милан, Италия), при разведении каждого из них до концентрации 1:1000. Иммуноокрашивание детектировали с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена иммуноглобулинов к антителам кролика или мыши в течение 1 ч. при комнатной температуре.

10 Уровень белка измеряли с использованием субстрата SuperSignal Substrate (Pierce, Euroclone, Милан, Италия); количественное определение осуществляли денситометрии с помощью программного комплекса для анализа изображений IMAGEJ.

Статистический анализ

15 Для получения всех данных по экспрессии генов использовались двусторонние двухвыборочные t-тесты для сравнения значений между контрольными и обработанными клетками. Р-значение < 0,05 считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

20 Композиция α 5m более эффективна, чем композиция ВСААет для восстановления биогенеза и функции митохондрий печени, нарушенных потреблением EtOH.

Оценивали способность композиций ВСААет и α 5m улучшать биогенез и функцию митохондрий, нарушенных воздействием EtOH. Чтобы исследовать молекулярные механизмы эффектов, оказываемых композициями ВСААет и α 5m, использовали *in vitro* модель печеночной токсичности EtOH.

25

С этой целью клетки печени HepG2 подвергали воздействию 75 мМ EtOH с композициями ВСААет и α 5m или без них в течение 9 дней.

30 Уровни коактиватора-1 α γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PGC-1 α), ядерного респираторного фактора-1 (NRF-1), фактора

А транскрипции митохондриальной ДНК (Tfam) и кодирующих цитохром с мРНК не изменились или были немного ниже в клетках HepG2, которые подвергались воздействию 75 мМ EtOH в течение 9 дней, по сравнению с необработанными контрольными клетками (рис. 1).

5 Однако введение композиции ВСААем и $\alpha 5m$ в течение 9 дней увеличивало уровни мРНК PGC-1 α и Tfam по сравнению как с необработанными, так и с обработанными EtOH клетками (рис. 1).

Примечательно, что эффективность композиции $\alpha 5m$ для увеличения количества маркеров митохондриального биогенеза печени была статистически выше, чем у ВСААем.

Анализ аутофагии

Уровень процессов аутофагии можно определить, используя несколько маркеров, включая уровень белка p62/SQSTM1 плюс соотношение LC3II/LC3I, Beclin1 и Atg7, а также фосфорилирование 4EBP1 (Klionsky et al., 2016). Было обнаружено, что белок p62/SQSTM1 содержится в аутофагосомах и деградирует в аутолизосомах. Следовательно, пониженный уровень белка p62/SQSTM1 указывает на усиление аутофагии (Klionsky et al. 2016).

Как показано на Фиг. 2 настоящей заявки, уровень белка p62 был ниже в клетках HepG2, которые подвергали воздействию 75 мМ EtOH в течение 9 дней, чем в необработанных контрольных клетках.

Однако после 9 дней применения композиций ВСААем или $\alpha 5m$ уровень белка p62 был выше по сравнению с уровнем p62 как в необработанных, так и в обработанных EtOH клетках.

25 И в этом случае эффективность композиции $\alpha 5m$ была статистически выше, чем эффективность композиции ВСААем.

Количественное определение аминокислот в печени

Как показано выше, измененный метаболизм аминокислот, особенно низкие уровни циркулирующих аминокислот ВСАА, является отличительным признаком алкогольной болезни печени (Charlton, 2006).

Приведенные ниже данные относятся к влиянию композиций ВСААем или $\alpha 5m$ на метаболизм аминокислот в печени крыс, хронически потребляющих EtOH.

5 С этой целью с помощью хроматографического анализа измеряли уровни свободных аминокислот в ткани печени крыс, потребляющих только EtOH или в комбинации с исследуемыми композициями.

10 Как показано в таблице 3, добавление композиций ВСААем и $\alpha 5m$ не оказывало влияния на уровень аргинина, лейцина и триптофана. Напротив, потребление EtOH приводило к снижению уровней этих аминокислот в печени.

Интересно, что введение композиций ВСААем и $\alpha 5m$ крысам, потребляющим EtOH, предотвращало снижение уровня аргинина, лейцина и триптофана.

15 Кроме того, концентрации изолейцина, серина, тирозина и валина были ниже в печени мышей, находящихся на EtOH-содержащей диете.

Хотя добавка ВСААем не смогла предотвратить снижение уровня изолейцина и валина, добавка $\alpha 5m$, напротив, также была эффективна в предотвращении вызванного EtOH снижения уровня этих аминокислот.

20 Концентрации остальных аминокислот статистически не различались у животных разных групп.

Эти результаты согласуются со специфической способностью композиции $\alpha 5m$, не присущей композиции ВСААем, восстанавливать уровень ВСАА в печени крыс, потребляющих EtOH.

Таблица 3

	контроль	ВСААем	$\alpha 5m$	EtOH	EtOH +	EtOH +	
					EtOH +	EtOH +	
					ВСААем	$\alpha 5m$	
Аланин	670,1	± 832,0	± 932,0	± 691,2	± 679,0	± 703,0	±
	65,7	25,0	34,0	128,0	110,0	90,0	

Аргинин	6,6 ± 0,7	4,3 ± 0,8	5,3 ± 0,7	2,46 ± 0,5*	4,3 ± 0,7#	4,6 ± 0,5#
Аспарагин	8,9 ± 2,4	7,9 ± 2,7	9,1 ± 1,7	8,1 ± 2,1	6,9 ± 2,8	7,8 ± 2,3
Глицин	409,8 ± 78,2	479,8 ± 32,0	442,8 ± 54,0	424,1 ± 52,0	440,7 ± 67,2	416,7 ± 59,2
Глутамино вая кислота	5232,0 ± 430,0	5394,0 ± 438,0	5193,0 ± 328,0	5970,5 ± 832,0	4717,70 ± 850	4928,67 ± 550
Гистидин	527,9 · 103 ± 80,3 · 103	606,8 · 103 ± 10,8 · 103	705,8 · 10 ± 10,5 · 10 3	461,1 · 103 ± 44,6 ± 103	406,0x10 ± 3	606,0x103 ± 11,3 · 103
Изолейцин	141,9 ± 29,7	144,4 ± 4,5	153,4 ± 3,4	92,9 ± 16,6*	93,2 ± 17,9*	143,1 ± 16,4#
Лейцин	195,0 ± 56,4	189,1 ± 81,9	197,1 ± 71,6	110,2 ± 18,8 *	188,9 ± 92,4#	195,8 ± 82,3#
Лизин	72,2 ± 16,8	90,5 ± 19,7	87,5 ± 17,8	62,3 ± 9,6	53,3 ± 6,4	67,2 ± 7,3
Метионин	12,9 ± 5,5	17,9 ± 5,3	16,5 ± 3,9	11,9 ± 3,9	17,8 ± 4,7	15,9 ± 5,1
Фенил-	32,0 ± 36,4 ± 4,8	39,2 ± 27,7	27,7 ± 28,8	28,8 ± 35,6 ± 4,5		

аланин	13,2		3,3	10,2	5,2		
Пролин	33,7 ± 5,2	33,5 ± 1,3	33,9 ± 2,3	27,2 ± 8,7	24,6 ± 4,2	31,7 ± 3,9	
Серин	348,7 ± 33,9	362,4 ± 9,9	385,4 ± 10,9	220,7 ± 58,4*	215,4 ± 43,0*	342,4 ± 39,1*	
Треонин	55,5 ± 2,41	52,2 ± 2,0	51,2 ± 1,7	52,9 ± 2,5	51,5 ± 2,2	53,5 ± 1,7	
Триптофан	1252,8 · 10 ³ ± 226,4 · 10 ³ 3	1350,4 · 10 ³ ± 74,54 · 10 ³	1299,4 · 10 ³ ± 99,4 · 10 ³ 3	787,1 · 10 ³ ± 112,7 · 10 ³ 3*	1038,2 · 10 ³ ± 169,9 · 10 ³ 3#	1178,2 · 10 ³ ± 178,9 · 10 ³ 3#	
Тирозин	514,5 ± 63,3	382,6 ± 19,7	472,6 ± 29,7	311,7 ± 71,89*	274,6 ± 39,7*	354,8 ± 35,6*	
Валин	429,9 ± 46,7	455,3 ± 17,7	564,3 ± 20,7	291,9 ± 61,1	290,8 ± 48,9	450,8 ± 62,7#	

Значения представлены как средние значения ± стандартное отклонение (пмоль/мг ткани), n = 4 животных/группа; *P < 0,05 по сравнению с контрольной группой;

Значение #P < 0,05 по сравнению с группой EtOH.

- 5 Таким образом, результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, показывают, что добавление в диету композиции с активным агентом, содержащим комбинацию из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты, очень эффективно в предотвращении повреждения митохондрий гепатоцитов,
- 10 подвергшихся воздействию EtOH.

Этот эффект также сопровождается снижением уровня аутофагии (то есть повышением уровня белка p62), которая увеличивается (со снижением уровня белка p62) при воздействии EtOH.

EtOH сам по себе может усиливать аутофагию для компенсации токсичности EtOH, в частности, повреждение митохондрий, наблюдаемое в гепатоцитах, которые подверглись воздействию алкоголя, и в печени животных, потребляющих алкоголь.

Фактически, аутофагия - это клеточный механизм, направленный на устранение поврежденных органелл, включая митохондрии. Как показано в настоящей заявке, когда гепатоциты подвергаются воздействию алкоголя, и функция митохондрий снижается, повышенная аутофагия полезна для устранения нефункциональных митохондрий.

Описанные здесь аминокислотные композиции, содержащие комбинацию из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина с лимонной кислотой, янтарной кислотой и яблочной кислотой, способны предотвращать повреждение митохондрий, так что клетке не требуется «включать» аутофагию для поддержания своей энергетической функции. Следовательно, аутофагия снижается (о чем свидетельствует повышенный уровень белка p62, что показано в настоящей заявке).

Более того, что наиболее важно, было обнаружено, что описанные композиции очень эффективны для восстановления концентраций свободных ВСАА, аргинина и триптофана в печени крыс, потребляющих EtOH.

Примечательно, что предварительные результаты экспериментов показывают, что описанные здесь аминокислотные композиции, содержащие комбинацию лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина с лимонной кислотой, янтарной кислотой и яблочной кислотой, также способны уменьшать диаметр липидных капель в гепатоцитах мышей, которые в течение 6 месяцев получали рацион с высоким содержанием жира (60% калорий получали из жира); это – широко используемая мышьяная модель НАЖБП. В целом эти результаты убедительно подтверждают

мнение о том, что аминокислотные композиции, описанные здесь и активные в при алкоголь-зависимой печеночной токсичности, могут быть полезны для предотвращения развития НАЖБП.

- 5 Из всего вышеизложенного ясно, каким образом композиции согласно настоящему изобретению полезны для профилактики и/или лечения заболеваний печени, которые распространены во всем мире и затрагивают большую часть взрослого населения, увеличивая общественные затраты.

Список литературы

- Charlton M. (2006) Branched-Chain Amino Acid Enriched Supplements as
5 Therapy for Liver Disease. *J Nutr* 136: 295S-298S.
- Cho HI, Choi JW, Lee SM (2014) Impairment of autophagosome-lysosome
fusion contributes to chronic ethanol-induced liver injury. *Alcohol* 48:717–725.
- Cooper GM and Hausman RE (2009) La cellula. Un approccio molecolare.
Bioenergetica e metabolismo. Mitochondri, cloroplasti e perossisomi. Piccin 11:
10 432-468.
- Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, Lu B, Stolz DB,
Clemens DL, Yin XM (2010) Autophagy reduces acute ethanol-induced
hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* 139:1740–1752.
- Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H (2010) mTOR regulation of
15 autophagy. *FEBS Lett* 584:1287–1295.
- Klionsky DJ et al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays
for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12:1–222.
- Lin CW, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, Dong XC, Yin XM
(2013) Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in
20 alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol* 58:993–999.
- Lin Wang, Bilon Khambu, Hao Zhang, Xiao-Ming Yin (2015) Autophagy in
alcoholic liver disease, self-eating triggered by drinking. *Clinics and research in
hepatology and gastroenterology* 39, S2-S6.
- Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan TM. (2014) A rapid,
25 sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B
Analyt Technol Biomed Life Sci* 944: 166-174.
- Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB and Bailey SM (2008)
Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and
30 obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 1259-
1272.

Ni H-M, Du K, You M, Ding W-X (2013) Critical role of FoxO3a in alcohol-induced autophagy and hepatotoxicity. *Am J Pathol* 183:1815–1825.

Pochareddy S, Edenberg HJ. (2012) Chronic alcohol exposure alters gene expression in HepG2 cells. *Alcohol Clin Exp Res* 36: 1021-1033.

- 5 Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, and Nisoli E. (2008) Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. *Diabetes* 57: 2028-2036.

- 10 Thomes PG, Trambly CS, Fox HS, Tuma DJ, Donohue TM Jr (2015) Acute and chronic ethanol administration differentially modulate hepatic autophagy and transcription factor EB. *Alcohol Clin Exp Res* 39:2354–2363. <https://doi.org/10.1111/acer.12904>.

- 15 Valerio A, D'Antona G, Nisoli E. (2011) Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: an evolutionary perspective. *Aging* 3: 464-478.

Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. (2013) Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc* 8: 17-32.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения в предотвращении и/или лечении заболевания печени у млекопитающего, содержащая активный агент, где
5 указанный активный агент содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

2. Композиция для применения по п. 1, в которой массовое
10 соотношение между совокупным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и совокупным количеством лейцина, изолейцина, валина, лизина, треонина составляет от 0,05 до 0,3, предпочтительно, от 0,1 до 0,25.

3. Композиция для применения по любому из предыдущих
15 пунктов, в которой массовое соотношение между совокупным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и совокупным лейцина, изолейцина, валина, составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно, от 0,15 до 0,35.

20 4. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение между лимонной кислотой и суммой яблочной кислоты и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно, от 1,5 до 2,5.

25 5. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно, от 7:1:1 до 1,5:1:1, более предпочтительно, от 5:1:1 до 3:1:1.

30

6. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой в которой указанный активный агент дополнительно содержит по меньшей мер, одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, тирозина, цистеина.

7. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой указанный активный агент дополнительно включает гистидин, фенилаланин, метионин, триптофан, цистеин и, опционально, тирозин.

8. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой соотношение между совокупным молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и совокупным молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана выше 1,35.

9. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой соотношение между совокупным молярным количеством трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты, и совокупным молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,10 до 0,70, предпочтительно, от 0,15 до 0,55.

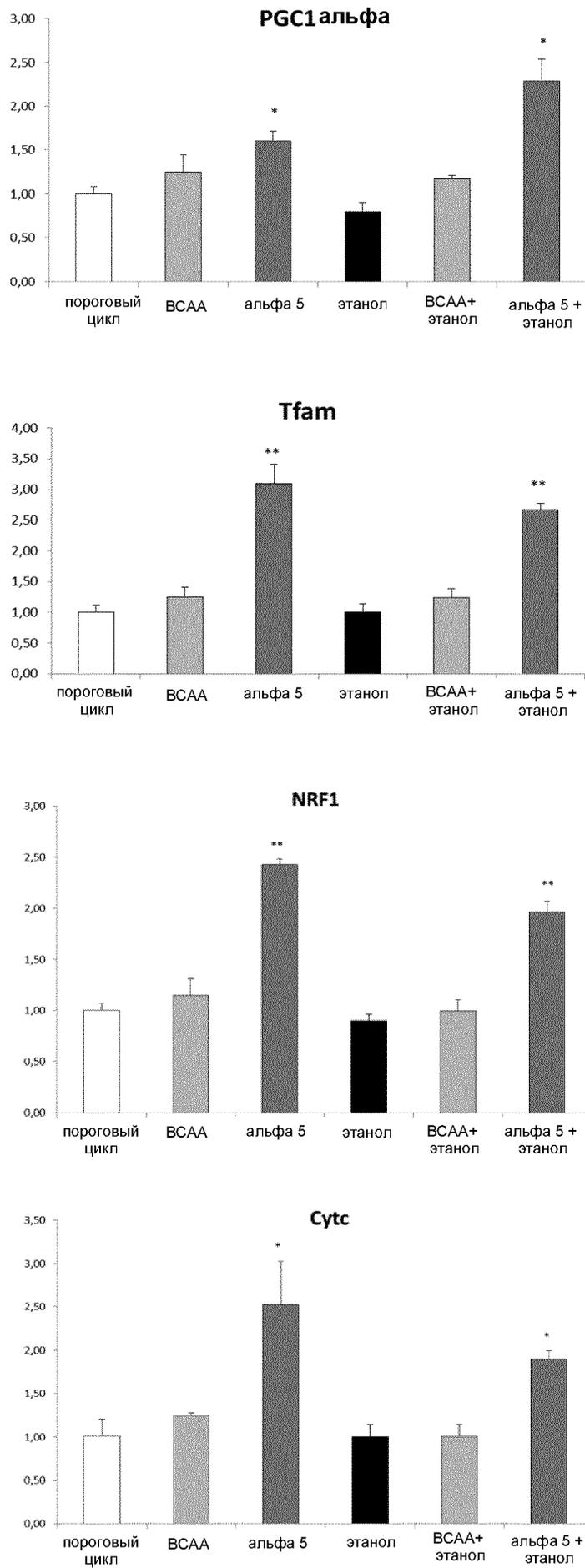
10. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем совокупное массовое или молярное количество совместно яблочной кислоты и янтарной кислоты.

11. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение между лейцином и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно, от 2,50 до 3,50.

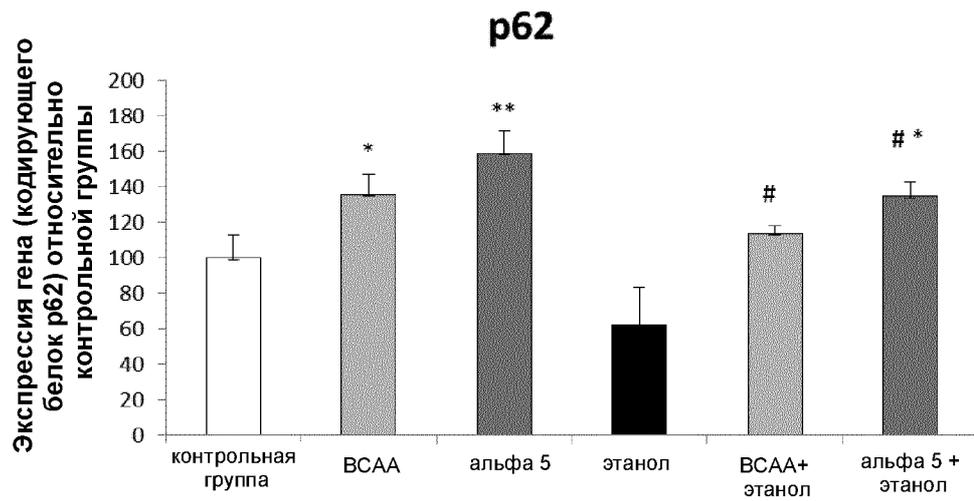
12. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, которая дополнительно содержит один или более витаминов, предпочтительно выбранных из группы витаминов В, более предпочтительно, витамин В1 и/или витамин В6.

13. Композиция для применения по любому из пп. 1-12, характеризующаяся тем, что заболевание печени выбрано из группы, состоящей из жировой болезни печени, липодистрофии, гепатита, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

14. Композиция для применения по п.13, характеризующаяся тем, что болезнь печени выбрана из алкогольной болезни печени (АБП) и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).



Фигура 1



Фигура 2