

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040650**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.11

(21) Номер заявки
201890810

(22) Дата подачи заявки
2016.09.26

(51) Int. Cl. **C07C 51/215** (2006.01)
C07D 319/06 (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01)
A61K 31/191 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ, ЭФФЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ И СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/222,959; 62/257,697;**
PCT/CN2016/078039

(32) **2015.09.24; 2015.11.19; 2016.03.31**

(33) **US; US; CN**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/CN2016/100187**

(87) **WO 2017/050298 2017.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИНЬЮ ФАРМА ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:
Ху Оливер Йоа-Пу, Ших Тун-Юань,
Сюн Чэн-Хуэй, Хо Синь-Тянь (CN)

(74) Представитель:
Виноградов С.Г. (BY)

(56) Mahcamov R. R. et al.: "Synthesis of hydroxyl-containing esters of hexylenesuccinic acid and their effect on surface tension at a mercury-solution interface", *Uzbeksku Khimicheskui Zhurnal*, Vol. 3-4, 31 December 1992 (1992-12-31), pages 27-30

Rohrdanz D. et al.: "Structure of esters of sorbitol with succinic acid", *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Vol. 79, No 9, 31 December 1983 (1983-12-31), pages 285-289

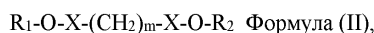
Mahcamov R. R. et al.: "Synthesis of hydroxyl-containing esters of hexylenesuccinic acid and their effect on surface tension at a mercury-solution interface", *Uzbeksku Khimicheskui Zhurnal*, Vol. 3-4, 31 December 1992 (1992-12-31), pages 27-30

Rohrdanz D. et al.: "Structure of esters of sorbitol with succinic acid" *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Vol. 79, No 9, 31 December 1983 (1983-12-31), pages 285-289

CN-A-1939929

WO-A2-2006010083

(57) Изобретение относится к соединениям, являющимся эффективными при лечении гепатотоксичности и стеатоза печени, и к их применению. В соответствии с одним из аспектов осуществления настоящего изобретения соединения настоящего изобретения представлены формулой (II) ниже



где X обозначает C=O; R₁ и R₂ являются одинаковыми или различными, выбранными из группы, включающей водород, полиоловую группу, сахаридную группу (G)_p, причем полиоловая группа является -CH₂-(CHОН)_nCH₂ОН, где n обозначает целое число от 1 до 18, G обозначает моносахаридный остаток и p обозначает целое число от 1 до 2, при этом по меньшей мере одна из гидроксильных групп в (G)_p замещена атомом галогена, при этом, когда R₁ является водородом, то R₂ не является водородом; и m обозначает целое число от 1 до 7, или его фармацевтически приемлемая соль.

B1**040650****040650****B1**

Родственная заявка

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основе предварительной заявки США № 62/222,959, поданной 24 сентября 2015 г., предварительной заявки США № 62/257697, поданной 19 ноября 2015 г., и заявки по договору о международной патентной кооперации № PCT/CN 2016/078039, поданной 31 марта 2016 г., содержание которых включено в данный документ по ссылке во всей его полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям, являющимся эффективными при лечении гепатотоксичности и жировой болезни печени (стеатоза), и к их применению.

Предпосылки создания изобретения

Поражения органов могут быть вызваны токсичными веществами, такими как лекарственные препараты, при их передозировке, что зачастую приводит к поражению органов, в частности, печени или почек. Ацетаминофен (также известный под названием Панадол), также называемый парацетамол или N-ацетил-пара-аминофенол (АПАФ), является наиболее широко используемым обезболивающим и жаропонижающим препаратом на рынке лекарственных средств. Ежегодно появляется информация о многочисленных случаях лекарственных интоксикаций или самоубийств, обусловленных ненадлежащим применением АПАФ, и при этом поражение печени, вызванное АПАФ, является основной причиной тяжелых заболеваний и летальных исходов. Алкоголь или органические растворители, такие как четырёххлористый углерод (CCl_4), также могут вызвать гепатотоксичность. Ряд клинических исследований продемонстрировал, что вызываемая АПАФ гепатотоксичность является предупреждаемой и раннее диагностирование в сочетании с оперативным введением антидота N-ацетилцистеина (НАЦ) позволяет предотвратить возникновение гепатотоксичности.

Раннее обнаружение передозировки ацетаминофена является необходимым, т.к. благоприятный прогноз может быть дан в том случае, если антидот введен в течение 8 ч после отравления. Первые признаки лекарственной интоксикации включают дискомфорт, тошноту и рвоту. Тем не менее, у ряда пациентов могут отсутствовать признаки интоксикации на ранней стадии (стадия 1) даже в том случае, если концентрации ацетаминофена в их крови находятся на уровне, указывающем на отравление, и нарушение функционирования печени явно указывают на ее дисфункцию. Признаки гепатотоксичности, такие как абдоминальная боль, непроходящая рвота, желтуха, боль в правом верхнем квадранте живота, как правило, проявляются спустя 24-48 ч после приема внутрь значительного количества ацетаминофена (стадия 2). Уровень аминотрансферазы в сыворотке крови обычно начинает повышаться спустя 16 ч после введения с проявлением клинических симптомов. Как правило, 3-я стадия наступает спустя 3-4 дня после приема, при этом может быть определена степень поражения печени и в этот период может быть дано предсказание дальнейшего течения болезни с высокой точностью. Симптомы гепатотоксичности прогрессируют от слабо выраженных симптомов с повышенными показателями функции печени ($AST > 1000 ME/l$) до тяжелого острого фульминантного гепатита, сопровождаемого метаболическим ацидозом, желтухой, гипергликемией, $AST > 1000 ME/l$, аномальным свертыванием крови и очаговыми поражениями печени/мозга. На 4-й стадии интоксикация вызывает олигурическую почечную недостаточность или в тяжелых случаях смерть.

У ряда пациентов с интоксикацией ацетаминофеном обнаруживается только легкое поражение печени, однако при тяжелой почечной токсичности, вызываемой главным образом прямым метаболизмом АПАФ в P-450 (цитохром P450 (CYPs) почечного канальца. Тем не менее, острая почечная недостаточность также может быть обусловлена гепаторенальным синдромом, вызванным острой почечной недостаточностью, и фракционная экскреция Na (FeNa) может быть использована для установления отличия первичного поражения почек ($FeNa > 1$) от гепаторенального синдрома ($FeNa > 1$). Формула расчета для FeNa имеет следующий вид ($\text{Концентрация натрия в моче} \div \text{Концентрация креатинина в моче} \div (\text{Натрий в плазме} \div \text{Креатинин в плазме}) \times 100$). Максимальная концентрация ацетаминофена в крови достигается спустя 1-2 ч после перорального приема, и значительное количество элиминируется (перерабатывается) печенью, более чем 90% конъюгирует с глюкуронидом и сульфатом и образует нетоксичные метаболиты, и только менее 5% элиминируется различными CYP, включая CYP2E1, CYP1A2 и CYP3A4, среди которых CYP2E1 и CYP1A2 являются основными ферментами метаболизма. Метаболит, образованный указанными ферментами N-ацетил-p-бензохинонимин (NAPQI), является исключительно активным электрофилом. При нормальных условиях N-ацетил-p-бензохинонимин непосредственно вступает в реакцию с глутатионом в клетке и образует нетоксичный меркаптид. При передозировке ацетаминофена скорость потребления глутатиона превышает скорость его синтеза, и в том случае, если уровень глутатиона клетки становится ниже 30% от нормального уровня, N-ацетил-p-бензохинонимин начнет связываться с большими молекулами или нуклеиновыми кислотами, содержащими цистеин, что приводит к поражению печени. Исходя из результатов исследований с использованием гистохимических красителей, N-ацетил-p-бензохинонимин связывается с тиольной группой цистеина и образует ковалентную связь на центрилобулярных участках до возникновения некроза печени.

Пациенты с заболеванием печени, алкогольной зависимостью или принимающие лекарства, спо-

способные индуцировать активность цитохрома P450, такие как карбамазепин, этанол, изониазид, фенобарбитал (могут быть другие барбитураты), фенитоин, сульфипиразон, сульфонилмочевина, рифампин и примидон, являются восприимчивыми группами пациентов, у которых развивается тяжелая гепатотоксичность, вызываемая АПАФ, и которые с большей степенью вероятности подвержены летальному исходу, если у пациента разовьются такие осложнения, как острый респираторный дистресс-синдром, отёк головного мозга, неконтролируемое кровотечение, инфекция или синдром полиорганной недостаточности (MODS). Возьмем, например, алкоголь, который в основном выводится с помощью фермента CYP2E1 печени, и ее механизм интоксикации АПАФ включает три стадии: на первой стадии алкоголь конкурирует с рецепторами за CYP2E1 с АПАФ в печени и концентрация N-ацетил-р-бензохинонимина снижается на этой стадии; на второй стадии алкоголь продлевает период полураспада CYP2E1 с 7 до 37 ч, в результате чего повышается уровень CYP2E1 в печени, и на этой стадии происходит медленное повышение концентрации N-ацетил-р-бензохинонимина; и на третьей стадии во время выведения алкоголя из организма в печени содержится больше CYP2E1 для выведения ацетаминофена, и, таким образом, происходит существенное увеличение токсичных метаболитов ацетаминофена, что приводит к поражению печени. Недавние исследования показали, что диаллил сульфид способен эффективно предупреждать гепатотоксичность, вызванную ацетаминофеном у мышей, и, кроме того, продемонстрировали, что диаллил сульфид способен ингибировать активность CYP2E1. Предполагается, что защитный механизм диаллил сульфида против гепатотоксичности, вызванной ацетаминофеном, заключается в ингибировании формирования промежуточного продукта превращения N-ацетил-р-бензохинонимина из ацетаминофена. Предыдущие исследования позволили выдвинуть предположение, что путем ингибирования могут быть снижены потребление восстановленного глутатиона в клетках печени, активация окисления, митохондриальная дисфункция и повреждение ДНК, вызванные N-ацетил-р-бензохинониминном, и, следовательно, может быть минимизировано поражение печени, вызываемое ацетаминофеном. Например, у *Rapax notoginseng*, аденозин и его производные - аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат и аденозинтрифосфат - могут предотвратить поражение печени, вызванное ацетаминофеном, за счет указанного защитного механизма.

Стеатоз печени считается еще одним фактором, ведущим к поражению печени. При нормальных условиях жир составляет 3% от веса печени. Клинически "стеатоз печени (жировая болезнь печени)" означает, что содержание жира в печени превышает 5% от веса печени, или что более 10% клеток печени проявляют везикулярное жировое перерождение в срезах ткани печени. В зависимости от причин заболеваний стеатоз печени можно классифицировать на алкогольную жировую болезнь печени (АЖБП), неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП) или другие жировые болезни печени, обусловленные такими факторами, как прием лекарств. Жировые болезни печени с точки зрения патологии характеризуются проявлением жирового перерождения или стеатоза, стеатогепатита или подобных перерождений. С учетом процентного содержания клеток печени, пораженных стеатозом, стеатоз печени можно подразделить на следующие категории: стеатоз легкой (<33%), средней (33-66%) и тяжелой (>66%) степени. Ранее считалось, что стеатоз печени является доброкачественным обратимым состоянием, и, следовательно, не вызывает серьезных опасений, однако недавние исследования позволили обнаружить, что указанное заболевание приводит к тяжелому фиброзу печени и циррозу и даже раку печени. По мере роста численности населения, страдающего от ожирения, распространенность жировых болезней печени также возрастает. Основная причина заболеваний печени в странах Европы и Америки обусловлена хроническим злоупотреблением алкоголем, следовательно, большинство болезней печени вызвано алкогольным повреждением органов. Однако за последние 15-20 лет неалкогольная жировая болезнь печени стала первопричиной заболеваний, которые рассматриваются как дисфункция печени в странах Европы и Америки. Thaler еще в 1962 г. описал неалкогольную жировую болезнь печени. В 1980 г. Ludwig предложил ввести термин "неалкогольный стеатогепатит", развивающийся в результате неалкогольной жировой болезни печени, выявленной им в группе пациентов-женщин с ожирением, диабетом и гиперлипидемией. Позднее в 1986 г., Schaffner также подчеркнул, что неалкогольный стеатогепатит сыграл важную роль в механизме возникновения фиброза в течение неалкогольной жировой болезни печени. До 1998 г. Day обнаружил, что 15-50% пациентов с неалкогольным стеатогепатитом страдали от возникшего фиброза различной степени, в связи с чем врачи-клиницисты начали обращать внимание на неалкогольную жировую болезнь печени. В настоящее время дополнительно к алкогольной жировой болезни печени неалкогольный стеатогепатит не является лишь стадией в естественном прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени в клинической практике. Ввиду наличия неалкогольного стеатогепатита неалкогольная жировая болезнь печени более не считается доброкачественным заболеванием печени. Рассматривая механизм неалкогольной жировой болезни печени, Day и James (Великобритания) выдвинули гипотезу "двойного удара" на основе большого числа клинических исследований и экспериментов на животных. Стеатоз печени возникает после "первого удара", и стеатогепатит возникает после "второго удара". Первый удар инициируется чрезмерным накоплением жира в печени вследствие ожирения, гиперлипидемии и т.д. Второй удар обусловлен оксидативным стрессом и действием активных форм кислорода (ROS) в митохондриях, в результате чего возникает перекисное окисление липидов на мембране клеток печени, происходит высвобождение исходных воспалительных цитокинов и свободных радикалов

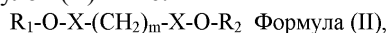
и возникает фиброз ввиду активизации звездчатых клеток, приводя к некрозу печени. Механизм неалкогольного стеатогепатита включает перекисное окисление триглицерида, оксидативный стресс, реакцию активных форм кислорода (ROS), повышенное перекисное окисление липидов в клетках печени, или увеличение числа цитокинов и активности ферментов печени, приводя к ряду аутоиммунных взаимодействий.

Причины стеатоза печени в основном связаны с долгосрочным чрезмерным потреблением животного жира, белка, углеводов, избыточных калорий, преобразующихся в жир, накапливаемый в организме, приводя к ожирению и стеатозу печени. Пациенты со стеатозом печени могут иметь нормальные показатели глутамат оксалоацетат трансминазы/глутамат-пируват трансминазы в крови. Таким образом, для постановки правильного диагноза стеатоза печени необходимо провести ультразвуковое исследование органов брюшной полости, которое в настоящее время позволяет достичь 97% точности. В настоящее время отсутствует идеальное лекарственное средство, обеспечивающее достижение конкретного терапевтического эффекта при жировой болезни печени, протокол лечения которого направлен на снижение факторов потенциального риска и контроля за течением хронических заболеваний путем применения лекарственных средств. Рекомендуется применять симптоматическое лечение в зависимости от причин, вызывающих стеатоз печени. Например, лица, страдающие от стеатоза печени, вызванного избыточным весом, должны постепенно сбросить вес. Лицам, страдающим от алкогольного стеатоза печени, следует отказаться от употребления спиртного и перейти на сбалансированную диету для улучшения своего состояния.

Необходимо немедленно прекратить прием химических веществ и лекарственных средств, поражающих печень и приводящих к жировой болезни печени ввиду долгосрочного поступления указанных веществ и препаратов в печень. При стеатозе печени, вызванном такими заболеваниями, как гепатит С, высокое содержание жиров в крови, и т.д., необходимо лечить основную болезнь, например, проводить курс лечения гепатита С или регулировать содержание липидов крови. Тем не менее, если чрезмерное содержание триглицеридов обусловлено индивидуальными физическими факторами, снижение веса вряд ли будет способствовать устранению жировых болезней печени. Тем не менее, существующие лекарственные средства, обычно используемые в клинической практике для снижения триглицеридов и холестерина в сыворотке крови, зачастую вызывают побочные эффекты, например гепатотоксичность, миопатию, такую как миалгия, миозит, рабдомиолиз и подобные. При использовании гиполипидемических препаратов мышечная токсичность является наиболее характерным побочным эффектом. В частности, при использовании статинов могут наблюдаться наиболее серьезные побочные эффекты, проявляющиеся в мышечной токсичности с последующей выработкой фиброевой кислоты. Кроме того, гиполипидемические препараты создают эффект "перемещения жира", "перемещая" липиды крови к печени, в которой уже имеется накопленный жир, и, ввиду того, что печени трудно переработать приток липидов, происходит чрезмерное накопление жира в печени, что, в свою очередь, усугубляет течение стеатоза печени. Можно сделать вывод, что гиполипидемические препараты не являются приемлемыми для лечения стеатоза печени.

Краткое изложение сущности изобретения

В соответствии с одним из аспектов осуществления настоящего изобретения соединения настоящего изобретения представлены формулой (II) ниже:



где X обозначает C=O;

R_1 и R_2 являются одинаковыми или различными, выбранными из группы, включающей водород, полиоловую группу, сахаридную группу $(G)_p$, причем полиоловая группа является $-CH_2-(CHON)nCH_2OH$, где n обозначает целое число от 1 до 18, G обозначает моносахаридный остаток и p обозначает целое число от 1 до 2, при этом по меньшей мере одна из гидроксильных групп в $(G)_p$ замещена атомом галогена, при этом, когда R_1 является водородом, то R_2 не является водородом; и m обозначает целое число от 1 до 7, или его фармацевтически приемлемая соль.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусматривается создание фармацевтической композиции для профилактики или лечения гепатотоксичности, включающей по меньшей мере одно из соединений в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предусматривается создание способа профилактики или лечения гепатотоксичности путем введения нуждающемуся в лечении пациенту эффективного количества по меньшей мере одного из соединений в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для профилактики или лечения стеатоза печени или улучшения течения болезни печени, вызванной стеатозом печени, включающий введение субъекту эффективного количества соединений в соответствии с описанием. В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусматривается применение соединения в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для профилактики

или лечения гепатотоксичности, стеатоза печени или улучшения лечения болезни, вызванной стеатозом печени.

Ниже приведено подробное описание одного или более примеров осуществления настоящего изобретения. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения очевидны из следующего ниже подробного описания нескольких примеров его осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Более полное понимание краткого изложения существа изобретения, а также последующего детального описания предпочтительных примеров осуществления настоящего изобретения может быть достигнуто из следующего ниже подробного описания, в котором приводятся ссылки на прилагаемые чертежи. В целях иллюстрации изобретения на чертежах представлены примеры осуществления настоящего изобретения, которые в настоящее время являются предпочтительными. Тем не менее, следует понимать, что изобретение не ограничено точными конструкциями и устройствами, приведенными на чертежах. На чертежах:

фиг. 1 - процент остатка пролекарства или связанного с ним образования метаболитов в крови (in vitro);

фиг. 2 - график зависимости концентрации пролекарства и сукралозы в плазме крови от времени после перорального введения пролекарства крысам линии Спрег-Доули;

фиг. 3 - график зависимости концентрации маннитола в плазме крови от времени после перорального введения пролекарства крысам линии Спрег-Доули;

фиг. 4 - результаты окрашивания тканей печени гематоксилином - эозином у животных. (А) нормальная контрольная группа, (В) контрольная группа животных с поражениями печени, индуцированными АПАФ, (С) группа положительного контроля, проходящая лечение N-ацетилцистеином, (D) экспериментальная группа животных, проходящих лечение маннитолом (1,67 мг/кг), (Е) экспериментальная группа животных, проходящих лечение сукралозой (1,67 мг/кг), (F) экспериментальная группа животных, проходящих лечение маннитолом (2,51 мг/кг) в сочетании с сукралозой (2,51 мг/кг), (G) экспериментальная группа животных, проходящих лечение маннитолом (3,34 мг/кг) в сочетании с сукралозой (3,34 мг/кг), и (H) экспериментальная группа животных, проходящих лечение N-ацетилцистеином в сочетании с маннитолом (3,34 мг/кг) и сукралозой (3,34 мг/кг);

фиг. 5 - срезы печеночной ткани, взятые у мышей, у которых был индуцирован стеатоз печени, и далее прошедших лечение различными испытуемыми соединениями по группам в течение четырех недель;

фиг. 6 - общая схема процесса синтеза соединения настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Если не будет указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют одни и те же значения, обычно понимаемые специалистами в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, артикли "a" и "an" относятся к одному или более чем к одному (т.е., как минимум, к одному) грамматическому объекту, с которым употребляется артикль. Для примера, "элемент" означает один элемент или более чем один элемент I.

Соединения

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "алифатический" или "алифатическая группа" означает углеводородную часть, которая может быть прямоцепочечной (т.е. неразветвленной), разветвленной или циклической (включая конденсированную, мостиковую и спиро-конденсированную полициклическую часть) и может быть полностью насыщенной или содержать одно или более звеньев ненасыщения, но которые не являются ароматическими. В целом алифатические группы содержат 1-40 атомов углерода. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения алифатические группы содержат 1-20 атомов углерода, или 1-12 атомов углерода, 1-8 атомов углерода, или 1-4 атомов углерода. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения алифатические группы содержат 3-20 атомов углерода, или 3-12 атомов углерода, 3-8 атомов углерода, или 3-4 атома углерода. Приемлемые алифатические группы включают линейные или разветвленные, алкильные, алкенильные и алкинильные группы и их гибриды, такие как (циклоалкил)алкил, (циклоалкенил)алкил или (циклоалкил)алкенил, но не ограничиваются ими. В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения L группа в формуле (I) выбрана из (a) линейной алкильной группы, (b) разветвленной алкильной группы, (c) линейной алкильной группы, замещенной бензольным кольцом, (d) разветвленной алкильной группы, замещенной бензольным кольцом, (e) бензенильной группы, в которой бензольное кольцо содержит алифатическую группу с линейной цепью, и (f) бензенильную группу, в которой бензольное кольцо содержит алифатическую группу с разветвленной цепью.

Термин "полиоловая группа" в соответствии со значением, используемым в настоящем документе, означает спирт, содержащий несколько гидроксильных групп (две или более гидроксильные группы) на молекулу. В частности, полиоловая группа может быть линейной или кольцевой, замещенной или незамещенной, или их смесями, при условии, что полученный комплекс является водорастворимым и фарма-

цветически приемлемым.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения полиоловая группа представляет собой полиол СЗ-24, в частности полиол СЗ-20, в частности, полиол СЗ-12, или полиол СЗ-12, содержащий 2 или более гидроксильные группы. В более конкретных примерах осуществления настоящего изобретения полиоловая группа представлена $-\text{CH}(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$, где n обозначает 1-22, 1-18, 1-10 или 1-6. В одном определенном примере n обозначает 4.

Предпочтительными полиолами являются сахарные спирты. Примеры полиолов включают полиолы с 3 атомами углерода (например, глицерол, эритритол и трейтол); полиолы с 5 атомами углерода (например, арабитол, ксилитол и Рибитол); полиолы с 6 атомами углерода (например, маннитол, сорбитол, галактитол, фуцитол, идиотол и инозитол); полиолы с 12 атомами углерода (например, волемитол, изомальт, мальтитол и лактитол); полиолы с 18 атомами углерода (например, мальтотриитол) и полиолы с 24 атомами углерода (мальтотетраитол), но не ограничиваются им.

В формуле (I) G обозначает остаток моносахарида. Моносахарид в соответствии со значением, используемым в настоящем документе, предпочтительно представляет собой моносахарид с 6 атомами углерода, имеющий химическую формулу $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (т.е., гексоза). Гексоза может иметь D-конфигурацию, L-конфигурацию или сочетание указанных конфигураций. Как правило, гексозы классифицируются по функциональным группам. Например, альдогексозы имеют альдегид в положении 1, такой как аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза и талоза; и кетогексозы имеют кетон в положении 2, такой как психоза, фруктоза, сорбоза и тагатоza. Гексоза также содержит 6 гидроксильных групп, и альдегидная или кетонная функциональная группа в гексозе может вступать в реакцию с соседними гидроксильными функциональными группами, образуя внутримолекулярные гемиацетали или гемикетали, соответственно. Если полученный циклический сахар имеет 5-членное кольцо, то в данном случае он является фуранозой. Если полученный циклический сахар имеет 6-членное кольцо, то в данном случае он является пиранозой. Кольцо спонтанно открывается и закрывается, обеспечивая возникновение вращения вокруг связи между карбонильной группой и соседним атомом углерода, тем самым образуя две четко различимые конфигурации (α и β). Гексоза может иметь либо S-конфигурацию, либо R-конфигурацию.

В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере одна из гидроксильных групп в одном или более остатков моносахарида в формуле (I) замещена атомом галогена. Примеры атома галогена включают хлор, бром и йод. В частности, атом галогена является хлором.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "S" или "R" используется для названия оптического изомера по его конфигурации, не затрагивая меченую молекулу, называемой R/S системой. Система маркирует каждый хиральный центр R или S в соответствии с системой, по которой ее каждому лиганду присваивается приоритет в соответствии с правилами приоритета Кана - Ингольда - Прелонга с учетом атомного числа. Эта система маркирует каждый хиральный центр молекулы (и также имеет распространение на хиральные молекулы, не затрагивая хиральных центров). Если соединение имеет два хиральных центра, они могут быть маркированы, например, как (S,S) изомер и (S,R) изомер.

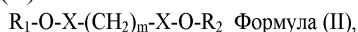
В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемая соль" включает соли присоединения кислоты. "Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты" относятся к солям, сохраняющим биологическую эффективность и свойства свободных оснований и получаемым с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.д.,

и органическими кислотами, такими как уксусная кислота, пропионовая кислота, пировиноградная кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, p-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота, трифторуксусная кислота и т.д.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения в формуле (I) q обозначает 2, 3 или 4, при этом по меньшей мере один R из группы отличается от другого R.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения в формуле (I) q обозначает 2.

В таких примерах осуществления настоящего изобретения соединение настоящего изобретения может быть представлено формулой (II) ниже:



где X обозначает C=O ;

R_1 и R_2 являются одинаковыми или различными, выбранными из группы, включающей водород, полиоловую группу, сахаридную группу (G)_p, при этом G обозначает моносахаридный остаток и p обозначает целое число от 1 до 100, при этом, по меньшей мере, одна из гидроксильных групп в (G)_p замещена атомом галогена, при этом, когда R_1 обозначает водород, то R_2 не обозначает водород; и m обозначает целое число от 1 до 40, или его фармацевтически приемлемую соль.

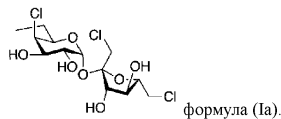
В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения в формуле (II) R_1 обозначает полиоловую группу и R_2 обозначает сахаридную группу (G)_p. В таком случае соединение формулы (II) считается конъюгатом полиолового компонента, связанного с сахарным компонентом линкером посредством

сложноэфирных связей. В частности, линкер представлен $-O-X-(CH_2)_m-X-O-$ (формула (L)), где X обозначает $C=O$ и m обозначает 1-40, 1-20, 1-12, 1-8 или 1-4, в частности m обозначает 3-20, 3-12, 3-8 или 3-4. В одном определенном примере m обозначает 4.

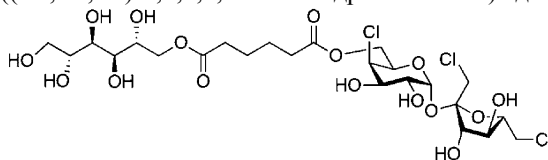
В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения p обозначает 2. Сахаридная группа представлена $-G_1-O-G_2$, где G_1 и G_2 являются одинаковыми или различными, выбраны из группы, включающей альдогексозу и кетогексозу, и по меньшей мере одна из гидроксильных групп в G_1 или по меньшей мере одна из гидроксильных групп в G_2 замещена атомом галогена.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения G_1 обозначает глюкозу, в которой одна из гидроксильных групп замещена хлором и G_2 обозначает фруктозу, в которой две из гидроксильных групп замещены хлором.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения сахаридная группа представлена формулой (Ia)

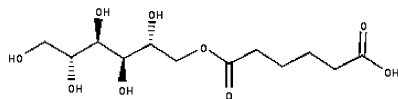


Отдельные примеры соединения настоящего изобретения приведены ниже: ((2R,3R,4R,5R,6R)-6-(((2R,5R)-2,5-бис(хлорметил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)окси)-3-хлор-4,5-дигидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил ((2R,3R,4R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил) адипат



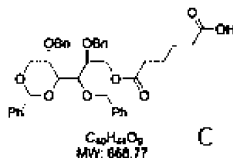
Формула 1, и

С6-маннитол формулы 2



Формула 2.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусматривается промежуточная формула C, приведенная ниже:

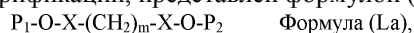


в которой Ph обозначает фенил и Bn обозначает бензил.

Соединение формулы (I) может быть химически синтезировано, например, с помощью процесса, как показано на общей схеме фиг. 6.

В частности, предусматривается создание линкерного агента, обеспечивающего образование одной или более групп $-COOH$ для проведения процесса эстерификации со спиртом. На этапе 1 линкерный агент, создающий первую группу $-COOH$ (другие, если таковые имеются, защищены), вступает в реакцию с R, имеющим первую свободную гидроксильную группу (другие, если таковые имеются, защищены), для дальнейшего проведения первого процесса эстерификации, обеспечивая создание соединения формулы (I), где q обозначает 1. На этапе 2 линкерный реагент, создающий вторую группу $-COOH$ (другие, если таковые имеются, защищены), вступает в реакцию с R, имеющим вторую свободную гидроксильную группу (другие, если таковые имеются, защищены) для дальнейшего проведения второго процесса эстерификации, создавая соединение формулы (I), где q обозначает 2. На этапе 3 линкерный реагент, создающий третью группу $-COOH$ (другие, если таковые имеются, защищены), вступает в реакцию с R, имеющим третью свободную гидроксильную группу (другие, если имеются, защищены), для дальнейшего проведения третьего процесса эстерификации, создавая соединение формулы (I), где q обозначает 3. На этапе 4 линкерный реагент, создающий четвертую группу $-COOH$ (другие, если таковые имеются, защищены), вступает в реакцию с R, имеющим четвертую свободную гидроксильную группу (другие, если таковые имеются, защищены), для дальнейшего проведения четвертого (третьего) процесса эстерификации, создавая соединение формулы (I), где q обозначает 4.

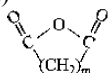
В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения линкерный реагент, предназначенный для проведения процесса эстерификации, представлен формулой (La)



в которой X и m определены так, как указано выше, и p_1 и p_2 являются одинаковыми или различными и обозначают защитную группу или H.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения линкерный реагент для проведения

эстерификации представлен формулой (La)



Формула (Lb).

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, "защитная группа" является химической группой, присоединенной к функциональному компоненту (например, к кислороду в гидроксильной группе или к азоту в аминогруппе, заменяя водород), для обеспечения защиты функциональной группы от протекания нежелательной реакции. Защитная группа включает, например, t-бутильную группу, циклоалкильную группу (например, циклогексильную группу), арильную группу (например, 2,4-динитрофенильную группу), аралкильную группу (например, бензильную группу, 2,6-дихлорбензильную группу, 3-бромбензильную группу, 2-нитробензильную группу, 4-диметилкарбамоилбензильную группу и трифенилметильную группу), тетрагидропиранильную группу, ацильную группу, алкоксикарбонильную группу (например, t-бутоксикарбонильную группу), аралкоксикарбонильную группу (например, бензилоксикарбонильную группу, 2-бромбензилоксикарбонильную группу), диалкилфосфинотиоильную группу (например, диметилфосфинотиоильную группу) и диарилфосфинотиоильную группу (например, дифенилфосфинотиоильную группу). Предпочтительная защитная группа включает ацильную группу и т.д. В одном отдельном иллюстративном примере приведена схема 1 (пример 1), иллюстрирующая конкретный процесс синтеза соединения настоящего изобретения.

II. Применение соединений по настоящему изобретению.

Соединения настоящего изобретения могут быть использованы в качестве лекарственных средств для их применения в методах лечения. В целом соединение формулы (I) выступает в качестве пролекарства, которое после введения может превратиться в метаболиты, создающие терапевтические эффекты по мере необходимости в соответствии с описанием, приведенном в настоящем документе. В одном примере соединение формулы (I) является соединением F, которое после введения может превратиться в маннитол, сукралозу и C6-маннитол, все из которых могут выступать в качестве ингибиторов цитохрома P450 и создавать, например, антигепатотоксичное действие. См. примеры ниже.

Настоящее изобретение предусматривает создание способа лечения путем введения нуждающемуся в лечении пациенту эффективного количества, по меньшей мере, одного из соединений в соответствии с описанием, приведенном в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Обнаружено, что соединения настоящего изобретения являются, например, эффективными в качестве ингибиторов цитохрома P450.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для предотвращения или лечения заболевания или состояния, характеризующегося повышенной активностью цитохрома P450 в организме субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Примеры таких заболеваний или состояний перечислены в табл. А.

Таблица А

	Заболевания
алкогольный гепатит	гепатобластома
медикаментозный гепатит	хроническая болезнь печени, почек
алкогольный цирроз печени	ожирение
заболевание печени	отравление
цирроз печени	резистентность к инсулину
алкогольная зависимость	хроническое заболевание печени
токсичность изониазида	хронический гепатит
неалкогольный стеатогепатит	болезнь почек
туберкулез	воспаление
гепатит	похмельный синдром
стеатоз печени	алкогольный цирроз
гепатоцеллюлярная карцинома	поражение печени
алкогольные болезни печени	алкоголизм
галотановый гепатит	токсический гепатит
алкогольный стеатоз печени	
стеатоз печени	некроз печени
алкогольные заболевания	цирроз
цереброваскулярные заболевания	острый алкогольный гепатит
ишемическая болезнь сердца	печеночная, почечная гистопатология
поражение клеток печени, почек	оксидативный стресс и поражение печени, вызываемые этиловым спиртом и ожирением
некроз печени, почек	отравление тяжелыми металлами
хронически гепатит С	фиброз печени
сердечнососудистые болезни	атеросклероз

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для предотвращения или лечения заболевания или состояния, характеризующихся повы-

шенным уровнем свободных радикалов у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для предотвращения или лечения поражений органов у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

В конкретных примерах поражаемые органы включают печень и почки.

В конкретных примерах поражение органов или гепатотоксичность вызваны лекарственным препаратом, CCl_4 или накоплением липидов.

В конкретных примерах лекарственным препаратом является ацетаминофен.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для предотвращения или лечения гепатотоксичности у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения способ настоящего изобретения предназначен для предотвращения или лечения стеатоза печени, защиты функции печени или улучшения течения болезни печени, вызванной стеатозом печени или другими, связанными с указанным заболеванием расстройствами.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "содержание жира в печени" относится к содержанию жира, накопленного в печени субъекта, и включает в широкое понимание этого термина липиды, такие как триглицерид (TG) и холестерин. В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "снижение содержание жира в печени" в целом относится к снижению аномально высокого содержания жира в печени у субъекта, т.е. снижение аномально высокого содержания жира печени, в частности снижение содержания избыточного жира в печени до нормального уровня. Например, при нормальных условиях доля жира составляет 3% от веса печени. Если жир в печени превышает 5% по весу от веса печени, такой жир рассматривается как избыточный жир (приведенное выше содержание жира в печени является относительным процентным показателем, указанным в иллюстративных целях, и это содержание может варьироваться в зависимости от этнической или расовой принадлежности и иных факторов). В соответствии со специфическим аспектом "снижение содержания жира в печени", используемым в настоящем документе, может означать, что содержание избыточного жира в печени у субъекта снижено с 5% от веса печени или более до 3% от веса печени. Содержание жира в печени можно определить на основе использования стандартных аналитических методов, включающих без ограничения ультразвуковой анализ, магнитно-резонансную томографию (МРТ), магнитно-резонансную спектроскопию (МРС), компьютерную томографию (КТ) и биопсию печени. В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "функция печени" относится к одной или более физиологическим функциям, выполняемых печенью. Функции печени можно проанализировать с применением широкого диапазона известных количественных анализов, таких как анализ аланинаминотрансферазы (ALT) или анализ аспартаттрансаминазы (AST). В соответствии с настоящим изобретением соединение, описание которого приведено в настоящем документе, может быть использовано для поддержания функции печени, в том числе для улучшения функции печени и предотвращения поражения печени.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "болезни печени" относится к повреждению или нарушению жизнедеятельности печеночных клеток, вызванному определенными факторами, которые впоследствии могут привести к нарушению функции печени. В соответствии с настоящим изобретением предлагаемое в настоящем документе соединение в некоторых примерах осуществления может быть использовано для улучшения течения заболеваний печени, вызванной стеатозом печени. Более конкретно, термин "поражение печени", используемый в настоящем документе, относится к печени с нарушением функции на основе гистологического и биохимического исследования в сравнении со здоровой печенью. В конкретном примере осуществления настоящего изобретения термин "поражение печени" относится к очаговым поражениям печени, вызванным алкогольными или неалкогольными факторами, такими как рацион с высоким содержанием жиров или ожирение, либо лекарственные препараты, либо органические растворители. В конкретном примере осуществления настоящего изобретения "поражение печени" может представлять собой повреждение тканей печени с одной или более характеристиками, выбранными из группы, включающей стеатоз, лобулярное воспаление, баллонирование гепатоцитов, везикулярные жировые капли, вырабатываемые клетками печени. В конкретном примере осуществления настоящего изобретения "поражение печени" может представлять собой биохимическое нарушение функции печени, которое может быть обусловлено активностью аланинаминотрансферазы или аспарат-трансаминазы. Повышенная активность аланинаминотрансферазы или аспарат-трансаминазы указывает на серьезную дисфункцию печени, в частности на биохимическое нарушение печени.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "оксидантная активность печени" относится к активности или способности противостоять оксидативному стрессу. Повышение оксидантной активности печени субъекта с помощью соединения в соответствии с настоящим изобретением относится к снижению оксидативного стресса, включает такое снижение, но не ограничено им, или относится к повышению ферментной активности или содержанию компонентов антиоксидант-

ных систем. Компоненты антиоксидантных систем могут представлять собой глутатионпероксидазу (GPx), глутатион (GSH), глутатионредуктазу (Grd) и (или) супероксиддисмутаза (SOD).

В соответствии с настоящим изобретением, соединение, описание которого приведено в настоящем документе, включает стандартные вспомогательные вещества и биофлавоноиды, которые могут быть использованы для снижения содержания жира в печени и улучшения течения сопутствующих заболеваний. Термин "сопутствующие заболевания", описание которого приведено в настоящем документе, включает заболевания, вызываемые избыточным накоплением жиров в печени, и охватывает без ограничения жировую болезнь печени, острую и хроническую алкогольную жировую болезнь печени, острую и хроническую неалкогольную жировую болезнь печени, острый и хронический алкогольный гепатит, острый и хронический неалкогольный стеатогепатит, неалкогольный цирроз и алкогольный цирроз (ICD-9-CM Коды диагноза: 571.8, 571.0, 571.1, 571.2, 571.3, 571.4, 571.5, 571.9).

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "предупреждение" относится к профилактическим мерам в отношении болезни, либо симптомов, либо патологических процессов при заболевании. Профилактические меры включают без ограничения применение или введение субъекту одного или более активных веществ, который еще не был диагностирован как пациент, страдающий от заболевания, либо симптомов, либо патологических процессов при заболевании, однако который может быть восприимчив или подвержен заболеванию. Цель профилактических мер заключается в избегании, предотвращении или отсрочке возникновения болезни, либо симптомов, либо патологических состояний при заболевании.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, термин "лечение" относится к терапевтическим мерам в отношении болезни, либо симптомов, либо патологических состояний при заболевании. Терапевтические меры включают без ограничения применение или введение одного или более активных веществ субъекту, страдающему от болезни, либо симптомов, либо патологических состояний при заболевании, либо обострения болезни. Цель терапевтических мер заключается в лечении, излечении, ослаблении, устранении, изменении, противодействии, облегчении течения, улучшении течения болезни, симптомов, либо патологических состояний при заболевании или воздействии на болезнь и физическое состояние, вызываемые заболеванием или обострением болезни.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, "ингибитор CYP2E1" представляет собой любое соединение, вещество или материал, способные ингибировать активность CYP2E1. Имеется ряд тестов для проведения анализа активности CYP2E1, такого как микросомный анализ печени человека или крысы. В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, пациент, нуждающийся в лечении в соответствии с настоящим изобретением, включает человека и других животных. Не относящиеся к человеческому роду животные включают без ограничения домашних животных, таких как кошки, собаки и т.д. сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи и т.д. Термин "эффективное количество" или аналогичный термин относится к количеству активного вещества, являющемуся достаточным для достижения требуемого терапевтического, профилактического и (или) биологического эффекта у субъекта, такого как снижение медикаментозных побочных эффектов, либо предотвращение, снятие, устранение, снижение или предупреждение одного или более симптомов, либо состояний, либо прогрессирования болезни. Фактическое эффективное количество может изменяться в зависимости от различных причин, таких как способ и кратность введения препарата, вес тела и вид особи, получающей указанный фармацевтический препарат, а также от цели введения. Специалисты в данной области техники могут определить дозировку в каждом случае на основании раскрытия изобретения в данном документе, установившихся методов и своим собственным опытом.

Термин "стандартная доза" в соответствии со значением, используемым в настоящем документе, относится к эффективной дозе терапевтического вещества, рекомендуемого авторитетным источником в фармсообществе, в том числе Управлением США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, и зачастую используемого в установленной практике. Термин "уменьшенная доза" в соответствии со значением, используемым в настоящем документе, относится к дозе, являющейся более низкой по сравнению со стандартной дозой, но по-прежнему сохраняющей в основном тот же самый терапевтический эффект одного и того же терапевтического вещества. В частности, в соответствии с настоящим изобретением уменьшенная доза лекарственного препарата составляет приблизительно 90% либо менее, 80% либо менее, 70% либо менее, 60% либо менее, 50% либо менее от стандартной терапевтической дозы лекарственного средства.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения рецептура эффективного количества активных ингредиентов в соответствии со значением, используемым в настоящем документе, может быть составлена в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции соответствующей формы с целью ее доставки и поглощения.

В соответствии со значением, используемым в настоящем документе, "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель совместим с активным ингредиентом в композиции и предпочтительно способен стабилизировать активный ингредиент, и, кроме того, носитель является безопасным для лица, получающего медицинскую помощь. Указанный носитель может представлять собой раствор для разведения, растворитель, вспомогательное вещество или матрицу к активному ингредиенту. Композиция мо-

жет дополнительно включать лубриканты; увлажняющие вещества; эмульгирующие и суспендирующие вещества; консерванты; подсластители и ароматизаторы. Композиция настоящего изобретения обеспечивает эффект быстрого, непрерывного или отсроченного высвобождения активного ингредиента после введения пациенту.

В соответствии с настоящим изобретением форма указанной композиции может включать таблетки, пилюли, порошки, таблетки для рассасывания, саше, троше, эликсиры, суспензии, лосьоны, растворы, сиропы, мягкие и твердые желатиновые капсулы, суппозитории, стерильные инъекционные жидкости и расфасованные порошки. Композиция настоящего изобретения может быть доставлена с помощью любого физиологически приемлемого способа, такого как пероральный, парентеральный (например, внутримышечный, внутривенный, подкожный и интраперитонеальный), трансдермальный, суппозиторный и интраназальный способы. Что касается парентерального введения, композицию предпочтительно используют в форме стерильного водного раствора, который может включать другие вещества, такие как соли или глюкоза, являющиеся изотоническими с кровью. Приготовление соответствующей парентеральной композиции при стерильных условиях может быть осуществлено с использованием стандартных фармакологических способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, при этом исключается применение дополнительных инновационных методов.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I) настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемая соль могут быть использованы для предупреждения или лечения поражений в органах, например в печени или в почках, которые могут быть вызваны передозировкой лекарственных средств (например, ацетаминофеном) или злоупотреблением алкоголем, химическим веществом, биомолекулами или любым веществом, которое может оказать токсическое действие на эти органы.

В частности, поражения в печени могут включать травмы, повреждения или потерю гепатоцитов или поражения тканей печени, приводящие к нарушению функций печени или изменению содержания белков в печени. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения поражения печени в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, представляют собой острые поражения печени, являющиеся относительно быстро развивающимися поражениями, например, в течение менее 12 недель, в частности менее 6 недель с момента проявления симптомов. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения пациенты с острыми поражениями печени не имеют фоновых хронических заболеваний печени. В частности, поражения почек могут включать травмы, повреждения или потерю клеток почечного эпителия или поражения тканей почек, приводящие к нарушению функций почек. Такие поражения почек могут быть определены, например, на основе снижения скорости клубочковой фильтрации, сокращения диуреза, увеличения уровня креатинина в сыворотке, увеличения уровня цистатина С в сыворотке и т.д. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения поражения почек в соответствии с описанием, приведенном в настоящем документе, представляют собой острые поражения почек, которые могут заключаться во внезапном или быстром нарушении фильтрационной функции почек, например, в течение 14 дней, преимущественно в течение 7 дней, более преимущественно в течение 72 ч и наиболее преимущественно в течение 48 ч. В одном конкретном примере осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I) настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемая соль обеспечивают предупреждение или лечение нежелательных состояний, вызываемых N-ацетил-р-бензохинониминном.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает использование соединения формулы (I) настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для предупреждения или лечения нежелательного состояния, вызываемого N-ацетил-р-бензохинониминном у субъекта. Настоящее изобретение также предусматривает создание способа, предназначенного для предупреждения или лечения нежелательного состояния, вызываемого N-ацетил-р-бензохинониминном у субъекта, нуждающегося в таком лечении, предусматривающем введение субъекту соединения формулы (I) настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли в количестве, эффективном для предотвращения или лечения нежелательного состояния.

III. Комбинированное использование соединения настоящего изобретения с другим активным веществом.

Соединение настоящего изобретения и (или) его метаболиты могут быть введены в сочетании с одним или более дополнительными активными веществами, в частности, веществами, выступающими в качестве ингибиторов цитохрома P450 и (или) обеспечивающими антигепатоксическую активность, и (или) веществами с антистеатозной активностью для защиты печени, например, с целью достижения синергетического эффекта.

Описание некоторых активных веществ, действующих в качестве ингибиторов цитохрома P450 (названные "первые активные вещества") приведено в PCT/CN 2013/087049 (USSN 14/441,317, содержание которого включено в данный документ по ссылке во всей его полноте). Конкретные примеры таких ингибиторов цитохрома P450 включают без ограничения полиэтиленгликоль сорбитан монолаурат (Tween 20), микрокристаллическую целлюлозу, дигидрат дикальцийфосфата, Brij (бридж) 35, сахарин, маннитол, Кремофор RH40, сукралозу, кросповидон, гликолят крахмала натрия, Eudragit (Эудражит) S100, на-

трийроскармеллозу, Pluronic (плуроник) F68, ментол, гидроксипропилцеллюлозу с низкой степенью замещения, прежелатинизированный крахмал, Dextrates (декстраты) NF гидратированные, лимонную кислоту, Cremophor (кремофор) EL, Аэросил (аэросил) 200, Mupj 52, сорбиновую кислоту, лимонное масло, гидроксипропил целлюлозу, сорбитол, ацесульфам калия, гидроксипропилметилцеллюлозу, моногидрат лактозы, мальтодекстрин, Brij 58, Brij 76, Tween 80, Tween 40, PEG 400, PEG 4000, PEG 8000, Span 60, бензоат натрия, гидроксизтилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, Span 80, цикламат натрия, бегенат глицерина, железа оксид красный, моностеарат глицерина, Соповидон K28, ацетат крахмала, стеарат магния, лаурилсульфат натрия, Повидон K30, PEG 2000 и N-ацетилцистеин и их любое сочетание.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения одно или более первых активных веществ, используемых в сочетании с соединением формулы (I) настоящего изобретения, выбраны из группы, включающей дегидрат дикальцийфосфат, ментол, маннитол, сукралозу, N-ацетилцистеин и их любое сочетание. Описание некоторых активных веществ с антистеатозной активностью для защиты печени (называемых "вторые активные вещества") приведено в РСТ/CN 2016/078039, содержание которого включено в данный документ по ссылке во всей его полноте. Конкретные примеры активных веществ с антистеатозной активностью для защиты печени включают без ограничения (ii) второе активное вещество, выбранное из группы, включающей лаурилсульфат натрия, ментол, сукралозу, маннитол, сорбитол, сахарин, глицерин, бензоат натрия, железа оксид красный, прежелатинизированный крахмал, цикламат натрия, сорбиновую кислоту, лимонное масло, лимонную кислоту, бутилированный гидроксианизол, понцирин, изовитексин, эриодиктиол, эргостерол, β -мирцен, гиперозид, (+)-катехин, галангин, морин, сциадопитизин, дидимин, госсипин, лутеолин-7-глюкозид, (+)-таксифолин, транс-коричную кислоту, диосмин, линарин, ксилитол, лутеолин, свертиамирин, пуэрарин, флоридзин, синенситин, (-)-эпигаллокатехин, каемпферол, урсоловую кислоту, силимарин, (+)-лимонен, гесперидин, (-)-эпикатехин-3-галлат, силибин, формоноретин, этиловый эфир миристиновой кислоты, эйкозапентаеновую кислоту (EPA), вонгонин, повидон K-30, протокатеховую кислоту, умбеллиферон, гесперитин, нордигидрогваяретовую кислоту, неогесперидин, нарингин, (-)-эпикатехин, глицирризин, байкалин, кверцитрин, байкалеин и их любые сочетания.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения одно или более вторых активных веществ, используемых в сочетании с соединением формулы (I) настоящего изобретения, выбраны из группы, включающей лаурилсульфат натрия, ментол, сукралозу, маннитол, сорбитол, сахарин, глицерин, бензоат натрия, железа оксид красный, прежелатинизированный крахмал, цикламат натрия, сорбиновую кислоту, лимонное масло, лимонную кислоту, бутилированный гидроксианизол, понцирин, изовитексин, эриодиктиол, эргостерол, β -мирцен, гиперозид, (+)-катехин, галангин, морин, сциадопитизин, дидимин, госсипин, лутеолин-7-глюкозид, (+)-таксифолин, транскоричную кислоту, диосмин, линарин, ксилитол, лутеолин, свертиамирин, и их любые сочетания.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения одно или более вторых активных веществ, используемых в сочетании с соединением формулы (I) настоящего изобретения, выбраны из группы, включающей: пуэрарин, флоридзин, синенситин, (-)-эпигаллокатехин, каемпферол, урсоловую кислоту, силимарин, (+)-лимонен, гесперидин, (-)-эпикатехин-3-галлат, силибин, формоноретин, этиловый эфир миристиновой кислоты, эйкозапентаеновую кислоту (EPA), вонгонин, повидон K-30, протокатеховую кислоту, умбеллиферон, гесперитин, нордигидрогваяретовую кислоту, неогесперидин, нарингин, (-)-эпикатехин, глицирризин, байкалин, кверцитрин, байкалеин и их любые сочетания.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения одно или более вторых активных веществ, используемых в сочетании с соединением формулы (I) настоящего изобретения, выбраны из группы, включающей: эриодиктиол, маннитол, ментол, сукралозу, сахарин, и их любые сочетания.

В отдельных примерах осуществления настоящего изобретения одно или более вторых активных веществ, используемых в сочетании с соединением формулы (I) настоящего изобретения, выбраны из группы, включающей: (1) сочетание сахараина и маннитола, (2) сочетание ментола и маннитола, (3) сочетание сукралозы и маннитола, (4) сочетание эриодиктиола и маннитола, (5) сочетание эриодиктиола и сукралозы, (6) сочетание ментола, маннитола и эриодиктиола и (7) сочетание сукралозы, маннитола и эриодиктиола.

В частности, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и одно или несколько дополнительных веществ могут быть введены одновременно или последовательно.

В настоящем изобретении далее предусмотрено, что соединение формулы (I) настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемая соль позволяют предупреждать или проводить лечение нежелательных состояний, вызываемых N-ацетил-p-бензохинониминном.

В качестве конкретного примера настоящее изобретение предусматривает создание комбинированного препарата соединения формулы (I) и (или) его метаболитов с N-ацетилцистеином. Настоящее изобретение также предусматривает создание способа введения N-ацетилцистеина субъекту, нуждающемуся в таком лечении, включая введение субъекту N-ацетилцистеина в сочетании с соединением формулы (I) и (или) его метаболитами. В одном примере осуществления настоящего изобретения комбинированный препарат или способ настоящего изобретения является эффективным для предупреждения или лечения

заболевания или расстройства, для устранения которых N-ацетилцистеин является эффективным препаратом. В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения заболевание или расстройство, для лечения или профилактики которых предусматривается использование N-ацетилцистеина, выбраны из группы, включающей: миоклоническую эпилепсию, синдром острой дыхательной недостаточности у взрослых, отравление тяжелыми металлами, гриппозную инфекцию, сердечно-сосудистые заболевания, синдром Шегрена, хронический бронхит, эпилепсию (синдром Унферрихта-Лундборга) и ВИЧ-инфекцию.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано на приведенных ниже примерах, которые приведены скорее с целью демонстрации осуществления изобретения, чем его ограничения.

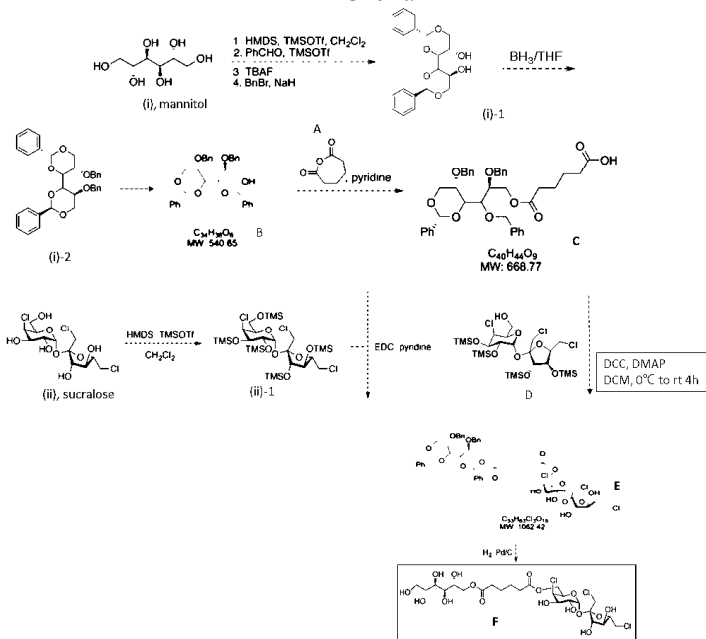
Примеры

Пример 1. Синтез соединения формулы 1 (соединение F) настоящего изобретения

Синтез ((2R,3R,4R,5R,6R)-6-(((2R,5R)-2,5-бис(хлорметил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)окси)-3-хлор-4,5-дигидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил ((2R,3R,4R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил) адипата (формула 1) (соединение F)

Стратегия синтеза для синтеза соединения F формулы 1 приведена на схеме 1.

Схема 1



(i) маннитол

(ii) сукралоза

ПИРИДИН

EDC - дихлорэтан

HMDS = гексаметилдисилазан

TMSOTf = триметилсилил трифторметансульфонат

ТВАФ = фторид тетрабутиламмония

THF = тетрагидрофуран

TMS = триметилсилил

DCC = дициклогексилкарбодиимид

DMAP = 4-диметиламинопиридин

DCM = дихлорметан

DMF = N,N'-диметилформамид

DIBAL = диизобутилалюминий

Вп = бензиловый эфир

Общие методы

Все химические вещества были получены из коммерческих источников и были использованы непосредственно после получения, если не указано иное.

Оценка хроматографической чистоты продуктов была проведена при следующих условиях:

Композиция мобильной фазы А: Метанол: Н₂О=5/95 (по объему), содержит 0,05% NH₄ОН

В: Метанол: Н₂О=95/5(по объему), содержит 0,5% NH₄OH

Хроматографическая система:

Время	Конус насоса В
0	15
1	15
5	80
5,1	15
10	15

Тип колонки Waters® Acquity UPLC HSST₃, 1,8 мкм, 100×2,1 мм

Температура автоматического пробоотборника	4°C
Температура термостата колонки	45°C
Расход	0,35 мл/мин
Продолжительность анализа	10 мин
Объем вводимой пробы	5 мкл
Время удерживания	4,8 мин

Анализ методом масс-спектропии был проведен при следующих условиях:

Параметры масс-спектрометра:

Масс-спектрометр - Тройной квадрупольный масс-спектрометр (API Qtrap5500)

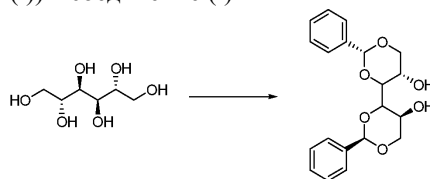
Applied Biosystem, Inc. Чувствительность - Определение числа отрицательных ионов в режиме MRM (мониторинг множественных реакций)

Пролекарство: m/z (масса/заряд) 688,9 $\rightarrow$ m/z 180,9

ЯМР-спектрометр Bruker AMX-500 в MeOH-d₄ (δ_H 3,30, δ_C 49,0) или CDCl₃ (δ_H 7,24, δ_C 77,0), в котором используется программа генерации эталонных импульсов фирмы Bruker; при проведении экспериментов с использованием методов гетероядерной многоквантовой корреляции (HMQC) и гетероядерной многополосной корреляции (HMBC) $\Delta = 1$ с и $J = 140,8$ Гц соответственно, корреляционные карты содержали 512×1 К точек данных на спектр, при этом каждый состоит из 16-64 переходных режимов.

1.1 Маннитол (соединение (i)) в соединение (B)

1.1.1 Маннитол (соединение (i)) в соединение (i)-1

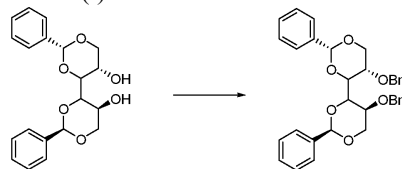


маннитол, соединение (i) соединение (i)-1

К раствору D-маннитола (25 г, 0,137 моль) в DMF (250 мл) добавляли бензальдегид (30 мл, 0,345 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере аргона. К смеси добавляли по каплям концентрированную серную кислоту (10 мл) при 0°C. После выдерживания смеси для постепенного нагрева до комнатной температуры смесь перемешивали в течение 3-х дней. Далее смесь вливали в ледяную воду (250 мл) и п-гексан (200 мл) при энергичном перемешивании. Затем смесь нагревали до комнатной температуры, осадок фильтровали и промывали п-гексаном. Осадок суспендировали в хлороформе и нагревали при дефлегмировании в течение 15 минут при энергичном перемешивании. После достижения смеси комнатной температуры, нерастворившийся осадок собирали и путем рекристаллизации из EtOH получали требуемый продукт в виде твердого вещества белого цвета (9,86 г, 20%).

$R_f = 0,45$ (EA/Hex = 1/1).

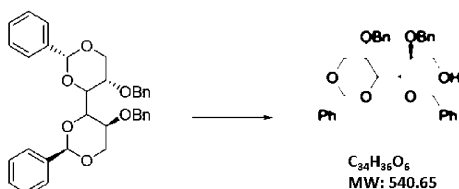
1.1.2 Соединение (i)-1 в соединение (i)-2



соединение (i)-1 соединение (i)-2

К раствору 1,3,4,6-дибензилидена (10 г, 27,9 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли бензилбромид (7,96 мл, 66,96 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере аргона. Смесь охлаждали до 0°C, далее добавляли 60% NaN (2,68 г, 66,96 ммоль). После выдерживания смеси для постепенного нагрева до комнатной температуры смесь перемешивали в течение ночи. Далее реакцию гасили водой (по каплям) и продукт реакции экстрагировали NaHCO_{3(aq)} и дихлорметаном. Органический слой высушивали MgSO₄ и концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом колончатой хроматографии на силикагеле и получали требуемый продукт. (10,39 г, 69%). $R_f = 0,2$ (EA/Hex = 1/6).

1.1.3 Соединение (i)-2 в соединение (B)



соединение (i)-2 соединение (B)

Раствор 2,5-дибензил-1,3,4,6-дибензилидена (1,5 г, 2,78 ммоль) в толуоле (12,5 мл) охлаждали до -18°C (баня с ледяной солью). 1,2 М диизобутилалюминия добавляли по каплям (18,5 мл, 22,3 ммоль) и нагревали до комнатной температуры. Спустя 1,5 ч реакционную смесь охлаждали до 0°C , затем ее гасили MeOH и 15% KOH_(aq). Затем смесь экстрагировали дихлорметаном, органический слой высушивали MgSO₄ и концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом колончатой хроматографии на силикагеле и получали требуемый продукт. (709 мг, 47%). $R_f = 0.1$ (EA/HEX = 1/5).

1.2 Сукралоза (соединение (ii)) в соединении (D)

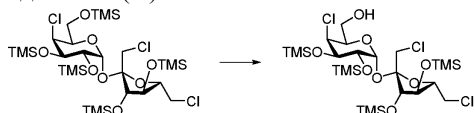
1.2.1 Соединение (ii) в соединении (ii)-1



сукралоза, соединение (ii) соединение (ii)-1

К раствору сукралозы (1 г, 2,5 ммоль) в дихлорметане (10 мл) добавляли гексаметилдисилазан (2,6 мл, 12,57 ммоль) и триметилсилил трифторметансульфонат (45 мкл, 0,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, пропускали через хлопчатобумажную ткань и промывали гексаном. Фильтрат снова концентрировали в вакууме для получения продукта в количестве 1,9 г. $R_f = 0,9$ (EA/HEX= 1/8).

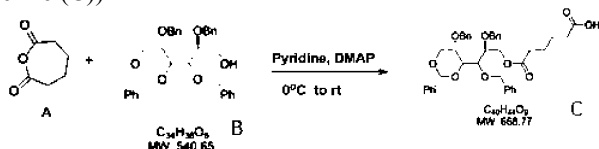
1.2.2 Соединение (ii)-1 в соединении (D)



соединение (ii)-1 соединение (D)

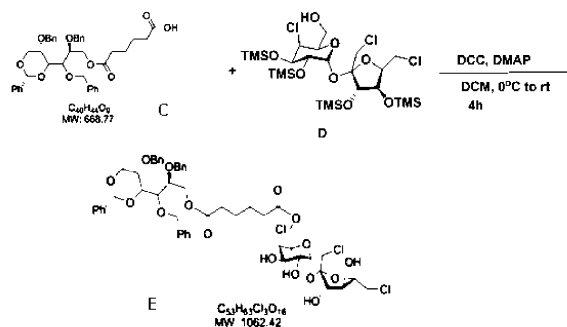
К раствору пента-TMS сукралозы (5 г, 6,6 ммоль) в пиридине (150 мл) добавляли 0,1 М раствора пиридин-TsCl (6,6 мл) и перемешивали в течение 3 дней при открытой колбе. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, очищали методом колончатой хроматографии на силикагеле и получали требуемый продукт (1,4 г 30%). $R_f = 0.5$ (EA/HEX= 1/8).

1.3 Синтез 6-оксо-6-((2R,3R,4R)-2,3,4-трис(бензилокси)-4-(2-фенил-1,3-диоксолан-4-ил)бутоксикапроновой кислоты (соединение (C))



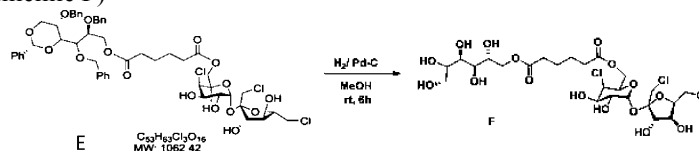
В высушенной пламенем круглодонной колбе соединение A (165 мг, 1 экв.) растворяли в дихлорметане (5 мл) при 0°C , далее к указанной смеси добавляли пиридин (0,2 мл) и 4-диметиламинопиридин (50 мг). Далее реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, затем добавляли композицию B (59 мг, 1,5 экв.). Реакционную смесь далее перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Методом тонкослойной хроматографии получали подтверждение о завершении реакции. Реакционную смесь выпаривали до сухого остатка на ротационном испарителе при пониженном давлении. Неочищенное соединение далее очищали методом колончатой хроматографии и получали требуемое соединение в виде бесцветного масла (136 мг, 67%).

1.4 Синтез ((2R,3S,4R,5R,6R)-6-(((2R,5R)-2,5-бис(хлорметил)-3,4-бис((триметилсилил)окси)тетрагидрофуран-2-ил)окси)-3-хлор-4,5-бис((триметилсилил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил ((2R,3R,4R)-2,3,4-трис(бензилокси)-4-(2-фенил-1,3-диоксолан-4-ил)бутил)адипата



К охлаждённому льдом раствору соединения С (100 мг, 1,0 экв.) в дихлорметане добавляли дициклогексилкарбодиимид (35 мг, 1,15 экв.) и перемешивали в течение 10 мин. Далее к указанной смеси добавляли соединение D (112 мг, 1,2 экв.) и 4-диметиламинопиридин (5 мг, 0,25 экв. каталитическое количество). Реакционную смесь выдерживали до достижения ею комнатной температуры и перемешивали в течение 4 часов. Методом тонкослойной хроматографии получали подтверждение о завершении реакции. Реакционную смесь выпаривали до сухого остатка на ротационном испарителе при пониженном давлении. Неочищенное соединение далее очищали методом колончатой хроматографии, используя нейтральный силикагель и 5-15% этилацетат в гексане с 1% триэтиламиноном в качестве элюента и получали требуемое соединение E в виде бесцветного масла (84 мг, 42%).

1.5 Синтез ((2R,3R,4R,5R,6R)-6-(((2R,5R)-2,5-бис(хлорметил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)окси)-3-хлор-4,5-дигидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил ((2R,3R,4R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил)адипата (соединение F)



В высушенной пламенем одногорловой круглодонной колбе соединение E (500 мг, 1 экв.) растворяли в сухом MeOH (20 мл), далее раствор дегазировали азотом (шприц с азотом был глубоко погружен в раствор и азот нагнетали в течение 15 мин).

Далее 10% Pd-C (200 мг, 33 вес.%) осторожно добавляли к реакционной смеси. Далее реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода из баллона в течение 6 ч. Методом тонкослойной хроматографии получали подтверждение о завершении реакции. Реакционную смесь далее фильтровали через целитовый слой, и слой промывали сухим метанолом. Фильтрат выпаривали до сухого остатка на ротационном испарителе при пониженном давлении. Полученное соединение далее выдерживали в условиях высокого вакуума и получали требуемое конечное соединение F в виде бесцветного полутвердого вещества или твердого вещества белого цвета (190 мг, 73%). Структура соединения F была определена методом масс-спектрометрии высокого разрешения и ^{13}C ЯМР.

Пример 2. Соединение F в качестве пролекарства, вырабатывающего метаболиты при инкубировании кровью (in vitro)

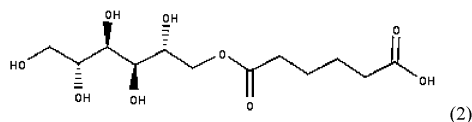
2.1 Материалы и методы

Свежевзятую цельную кровь человека использовали для изучения гидролиза лекарственного средства. Лекарственное вещество (10 мг, соединение F) растворяли в 1 мл раствора (20% метаноле). Гидролиз лекарственного средства (n=3) осуществляли в 20 мл аликвот свежевзятой цельной крови, содержащей 1,0 мг лекарственного вещества, в термостате с 50-мл колбой при 37°C во встряхивающей водяной бане. В нулевой момент времени добавляли лекарственное средство, и после различных периодов инкубирования пробы крови отбирали в 0,25, 0,5, 0,33, 0,75, 1, 2, 4, 6, 12 и 24 ч. Пробы крови использовали с 1 мл ацетонитрила для гашения процесса ферментативного гидролиза лекарственного средства по мере получения проб. Пролекарство и связанные с ним метаболиты, такие как C6-маннитол, маннитол и сукралоза в крови определяли трёхкратным масс-спектрометром API QTrap5500, снабженным источником электрораспылительной ионизации. Интерфейс электрораспылительной ионизации использовали в режиме определения отрицательных ионов.

2.2 Результаты

Мониторинг пролекарства проводили при переходе m/z 688,9-M 80,9.

Мониторинг сукралозы проводили при переходе m/z 395→359; мониторинг маннитола проводили при переходе m/z 452,3→273,3 и мониторинг C6-маннитола проводили при переходе m/z 309→101,1. Все соединения были определены методом масс-спектрометрии высокого разрешения и ^{13}C ЯМР. Структура C6-маннитола (формула (2)) имеет следующий вид:



Гидролиз пролекарства в крови был выражен путем графического отображения процентного содержания остающегося пролекарства и процентного содержания сукралозы, маннитола и С6-маннитола, возрастающего в зависимости от времени после инкубирования пролекарства в крови (фиг. 1). Результаты показывают, что соединение F действует как пролекарство, которое преобразуется в свои метаболиты, включая сукралозу, маннитол и С6-маннитол, после инкубирования кровью *in vitro*.

Пример 3. Фармакокинетическое исследование в экспериментах на крысах линии Спрег-Дуули (*in vivo*)

3.1 Материалы и методы

Крысам линии Спрег-Дуули перорально вводили пролекарство в дозе 3,67 мг/кг веса тела. Пробы крови были собраны в гепаринизированные микроцентрифужные пробирки с интервалами 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч. Пробы плазмы крови были непосредственно получены путем центрифугирования проб крови при 8000 об./мин в течение 10 мин. Пробы плазмы крови далее хранили при -80°C до момента их использования. Пробы плазмы крови были проанализированы для исследования пролекарства и связанных с ним метаболитов, таких как маннитол и сукралоза, с помощью трехквadrupольного масс-спектрометра API QTrap5500, оборудованного источником электрораспылительной ионизации. Интерфейс электрораспылительной ионизации использовали в режиме определения отрицательных ионов.

3.2 Результаты

Контроль за пролекарством проводили при переходе m/z 688,9→180,9.

Контроль за сукралозой проводили при переходе m/z 395→359; контроль за маннитолом проводили при переходе m/z 452,3→273,3 и контроль за С6-маннитолом проводили при переходе m/z 309→101,1.

На фиг. 2 и 3 показаны кривые зависимости концентрации пролекарства в плазме крови и связанных с ним метаболитов от времени, таких как сукралоза и маннитол, у крыс линии Спрег-Дуули при однократном пероральном введении пролекарства в дозе 3,67 мг/кг веса тела соответственно. Результаты показывают, что соединение F действует как пролекарство, которое преобразуется в свои метаболиты, включая сукралозу, маннитол и С6-маннитол, после введения животным *in vivo*.

Пример 4. Анализ ингибирования активности CYP2E1

4.1 Материалы и методы

В указанном примере приведено описание получения микросом из печени человека для скрининга ингибиторов изоферментов CYP450 *in vitro*. Было проведено тестирование эффективных ингибиторов изоферментов CYP450 в печени человека, и принцип тестирования ингибиторов изоферментов CYP450 основан на реакции микросомального изофермента CYP450, полученного из печени различного происхождения, и его специфического субстрата хлорзоксазона (CZX). После добавления испытуемого образца определенное количество стандартного метаболита 6-ОН-CZX (6-гидроксихлорзоксазон), полученного при участии изофермента цитохрома CYP450, в частности, используют для расчета показателя ингибирования изофермента цитохрома CYP450 CYP2E1 испытуемого образца с использованием определенного количества 6-ОН-CZX контрольной группы в качестве исходного уровня.

Все образцы были протестированы в трех параллельных опытах. С целью определения процента ингибирования каждое испытуемое соединение растворяли в 1, 2, 4 мкг/мл до трех различных концентраций. Уровни активности CYP2E1 в присутствии испытуемых соединений сравнивали с контрольными инкубациями. 500 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 мг микросомального белка, инкубировали с 320 мкмоль хлорзоксазона в присутствии 5 ммоль $MgCl_2$ и 1 ммоль никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (NADPH) в 50 ммоль фосфатного буфера со значением pH 7,4, при 37°C в течение 30 мин. Реакция была завершена охлажденным льдом ацетонитрилом и затем добавляли 4-гидроксил толбутамид в качестве внутреннего стандарта. Органическую фазу выпаривали до сухого остатка и восстанавливали до мобильной фазы (метанол:вода = 1:1) до проведения анализа методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Был использован трехквadrupольный масс-спектрометр API 3000, оборудованный источником электрораспылительной ионизации для определения 6-ОН-CZX в микросомах печени человека. Интерфейс электрораспылительной ионизации использовали в режиме определения положительных ионов. Был проведен контроль 6-ОН-CZX при переходе m/z 284,5→185,9.

Анализ результатов: преобразование значений детектированных сигналов, полученных методом LC/MS/MS, в количество (пмоль) метаболита стандартного 6-гидроксихлорзоксазона изофермента цитохрома CYP450, используя контрольную группу в качестве базового уровня, т.е. показатель ингибирования изофермента цитохрома CYP450 контрольной группы составляет 0%. Уровни активности изофермента цитохрома CYP450 в присутствии испытуемых соединений сравнивали с контрольными инкубациями.

4.2 Результаты

Диэтилдитиокарбаминавая кислота (DDTC) является хорошо известным ингибитором изофермента

CYP2E1. При концентрации 100 мкМ обработка диэтилдитиокарбаминовой кислотой позволяла достичь 90,9% ингибирования изофермента CYP2E1 в микросомах печени человека (определяемое с использованием хлорзоксазона в качестве субстрата изофермента CYP2E1). На основе наблюдаемой ингибиторной активности диэтилдитиокарбаминовой кислоты нами было проведено тестирование нового соединения (пролекарства) и связанных с ним метаболитов для ингибирования CYP2E1 при концентрациях 4, 2 и 1 мкг/мл. Результаты обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Показатели ингибирования ингибиторов изофермента CYP2E1 при скрининге микросом печени человека *in vitro*

Испытуемое соединение	Показатель ингибирования изофермента CYP2E1 (%)		
	4 мкг/мл	2 мкг/мл	1 мкг/мл
Концентрация тестовых соединений			
Контрольная группа	0	0	0
Положительный контроль (DDTC)	(100 мкМ) 90,9 ± 0,8	(50 мкМ) 51,2 ± 3,2	(10 мкМ) 11,2 ± 2,4
Пролекарство	45,7 ± 2,5	33,3 ± 4,1	17,7 ± 0,7
Метаболит 1 (маннитол)	40,3 ± 1,6	34,1 ± 4,1	30,1 ± 2,4
Метаболит 2 (сукралоза)	32,9 ± 4,6	30,2 ± 2,8	25,1 ± 1,4
Промежуточный метаболит (С6-маннитол с защитными группами, Формула С)	70,3 ± 2,8	56,5 ± 1,7	40,5 ± 2,3

Показатели ингибирования изофермента CYP2E1 испытуемого соединения, обнаруженного в микросомах печени человека, приведены в табл. 1. Исходя из результатов, было продемонстрировано, что испытуемые соединения, включающие пролекарство (соединение F) и его метаболиты, т.е. маннитол, сукралозу и С6-маннитол с защитной группой (формула С), являются эффективными в качестве ингибиторов изофермента CYP2E1 цитохрома Р450, при этом промежуточный метаболит пролекарства (т.е. С6-маннитол с защитными группами, формула С) при количестве 4 мкг/мл проявил наиболее высокий ингибирующий эффект (70,3±2,8%).

Пример 5. Анализ поражений печени, вызванных ацетаминофеном, (АПАФ) и CCl_4

5.1 Материалы и методы

5.1.1 Реагенты

Все органические растворители являются растворителями квалификации для ВЭЖХ и закуплены у компании "Tedia" (Fairfield, OH, USA). АПАФ закуплен у компании "Sigma" (St. Louis, MO USA), галактозу производит компания "Southern Photochemical Co.", и инъекционный раствор галактозы готовится путем растворения 400 г галактозы (Sigma) в 1 л буферного раствора, содержащего изотонические соли для инъекций.

5.1.2 Животные

Крысы-самцы линии Спрег-Дули весом 175-280 г были закуплены у National Laboratory Animal Center (NLAC), Тайвань. Исследование было проведено в соответствии с Руководством проведения исследований на животных Национального института исследований в области здравоохранения, и всех крыс размещали в помещении с регулируемой влажностью воздуха при 12-часовом дневном/12-часовом ночном циклах, при этом крысы не имели ограничений в воде и пище. В ходе проведения исследования постоянно осуществлялся контроль за весом крыс при нормальном потреблении ими воды.

5.1.3 Лечение

5.1.3.1 Поражения печени, вызванные АПАФ

Для выполнения испытаний на животных (крысы) были использованы маннитол и сукралоза с учетом поражений печени, вызванных АПАФ. В нормальной контрольной группе (группа 1) лабораторным животным не вводили АПАФ. В контрольной группе животных с поражениями печени, вызванными АПАФ (группа 2), животным вводили однократную дозу АПАФ в количестве 2000 мг на килограмм веса тела для индуцирования гепатотоксичности. В группе положительного контроля, в которой проводили лечение N-ацетилцистеином (группа 3), животным вводили однократную дозу АПАФ в количестве 2000 мг на килограмм веса тела для индуцирования гепатотоксичности и спустя 4 ч начинали 24-часовой курс лечения при зондовом введении соединения, включая первое введение 140 мг N-ацетилцистеина (на килограмм веса тела) и затем введение 70 мг N-ацетилцистеина (на килограмм веса тела) каждые 4 ч по пять раз. В экспериментальной группе (группа 4) животным вводили однократную дозу АПАФ в количестве 2000 мг на килограмм веса тела для индуцирования гепатотоксичности и спустя 4 ч приступали к 24-часовому курсу лечения при зондовом введении соединения, включая шесть доз с ингредиентами настоящего изобретения каждые 4 ч, как указано ниже:

(а) (группа 4.1): введение маннитола при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь каждые 4 ч в течение 24 ч;

(b) (группа 4.2): введение двойной дозы маннитола, как и в группе 4.1 каждые 4 ч в течение 24 ч;

(с) (группа 4.3): введение сукралозы при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь каждые 4 ч в течение 24 ч;

(d) (группа 4.4): введение двойной дозы сукралозы, как и в группе 4.3 каждые 4 ч в течение 24 ч;

(е) (группа 4.5): введение комбинации, в 0,5 раза превышающей дозу маннитола, как в группе 4.1, и

в 0,5 раза превышающей дозу сукралозы, как в группе 4.3 на килограмм веса тела каждые 4 ч в течение 24 ч;

(f) (группа 4.6): введение комбинации дозы маннитола, как в группе 4.1 и дозы сукралозы, как в группе 4.3 каждые 4 ч в течение 24 ч;

(g) (группа 4.7): введение комбинации, в 1,5 раза превышающей дозу маннитола, как в группе 4.1 и в 1,5 раза превышающей дозу сукралозы, как в группе 4.3, каждые 4 ч в течение 24 ч;

(h) (группа 4.8): введение комбинации двойной дозы маннитола, как в группе 4.1, и двойной дозы сукралозы, как в группе 4.3, каждые 4 ч в течение 24 ч и

(i) (группа 4.9): первое введение 140 мг N-ацетилцистеина на килограмм веса тела и позднее введение комбинации 70 мг N-ацетилцистеина в сочетании с двойной дозой маннитола, как в Группе 4.1, и двойной дозы сукралозы, как в группе 4.3, каждые 4 ч пять раз.

После проведения 24-часового курса лечения отбирали пробы крови из хвостовой артерии крыс для проведения анализа аспаратаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы. Далее крысы были подвергнуты тесту на GSP. В конечном счете крысы были умерщвлены для проведения гистологического анализа.

5.1.3.2 Поражения печени, вызванные CCl_4

Маннитол и сукралоза были выбраны из активных ингредиентов в соответствии с описанием, приведенном в настоящем документе, для проведения экспериментов на животных (мышях) с учетом поражений печени, вызванных CCl_4 . В нормальной контрольной группе животным вводили физиологический раствор путем интраперитонеальной инъекции. В контрольной группе животных с поражением печени, вызванной CCl_4 , животным интраперитонеально инъекционно вводили 10 мл/кг CCl_4 (40% в кукурузном масле) для индуцирования гепатотоксичности. В экспериментальной группе животным интраперитонеально инъекционно вводили 10 мл/кг CCl_4 (40% в кукурузном масле) для индуцирования гепатотоксичности и спустя 4 ч животным вводили через зонд различные ингредиенты настоящего изобретения. Пробы крови брали у мышей до введения ингредиентов настоящего изобретения или через 24 ч после введения ингредиентов настоящего изобретения для проведения анализа аспаратаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы. В конечном счете животных умерщвляли на 2-й день и брали у них пробы крови для проведения анализа аспаратаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы и проводили гистологическое исследование.

При этом другим экспериментальным группам мышей вводили ингредиенты настоящего изобретения в течение 12 недель и мышей подвергали тестам на GSP.

5.1.4 Пробы крови

После завершения курса лечения крыс умерщвляли под эфирным наркозом, брали пробы крови из хвостовой артерии крыс и помещали пробы в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК). Плазму крови центрифугировали со скоростью 13000 об./мин при 4°C в течение 15 мин и отделенную плазму перемещали по частям в пробирки Эппендорфа и хранили при -80°C.

5.1.5 Биохимический анализ

Поражение печени определяют количественно путем измерения активности аспаратаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы в плазме крови.

Аспаратаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза являются стандартными индикаторами гепатотоксичности, и их активность измеряется с помощью системы Synchron LXi 725 (Beckman Instruments, U.S.).

5.1.6 Оптический микроскоп

После умерщвления крыс проводили гистологический анализ. Образцы печени фиксировали 10% забуферированным фосфатом формалином, дегидрировали и заливали парафином. Были подготовлены срезы толщиной 5 мкм, которые далее окрашивали гематоксилином и эозином и подвергали окрашиванию реактивом Шиффа.

Окрашенные срезы изучали под оптическим микроскопом.

5.1.7 Количественное исследование функции печени

После завершения вышеописанного исследования всех крыс подвергали тесту методом GSP. Крысам внутривенно вводили 0,4 г/мл раствора галактозы в количестве 0,5 г/кг веса тела в течение 30 с и один образец крови отбирали из хвостовой вены через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после инъекции. Колориметрическую дегидрогеназу галактозы использовали для количественного определения концентрации галактозы и диапазонов концентрации тестовых соединений от 50 до 1000 мкг/мл.

Рассчитывали изменение каждой концентрации в течение дня с использованием стандартного отклонения и коэффициента вариации, и максимально допустимый коэффициент вариации составлял 10%, в то время как ежедневное изменение исследовали путем сравнения наклонных отрезков калибровочных кривых. GSP является концентрацией галактозы в крови, достигнутой спустя 60 с после прекращения 30-секундной инъекции.

5.1.8 Статистический анализ

Все данные представлены в диапазоне среднего значения плюс/минус стандартное отклонение (SD), и результаты подсчитаны с использованием метода дисперсного анализа (ANOVA) с целью определения

значимости. Пакет программ обработки статистических данных для социальных наук (Пакет программ обработки статистических данных) (Версия 13, SPSS Inc.) использовали для расчетов с последующим проведением ретроспективного анализа для определения наименьшей достоверной разности в отношении нескольких сопоставлений с целью подтверждения статистически значимой разницы между группами, и средняя разница между группами оказалась существенной при $p < 0,05$.

5.2 Результаты

5.2.1 Маннитол, сукралоза и другие ингредиенты, являющиеся эффективными при лечении пораженного печени, вызванных АПАФ

Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Параметры функции печени	GSP (мг/л)	AST (Ме/л)	ALT (Ме/л)	Общий индекс ИГА	Выживаемость (день 14-й, n/n)
Группа 1: Нормальный контроль (NC, n=6)	220 ± 24	186 ± 16	65 ± 16	0,0 ± 0,0	3/3
Группа 2: Контроль АПАФ (2000 мг/кг, n=12)	1017 ± 170	1151 ± 310	746 ± 143	8,6 ± 0,5	2/12
Группа 3: Лечение N-ацетилцистеином (140 мг/кг N-ацетилцистеина, далее 5 × 70 мг/кг N-ацетилцистеина через 4-часовые интервалы, n=6)	393 ± 68***	428 ± 74***	221 ± 69***	4,2 ± 0,8***	3/6
Группа 4.1 (n=3) (Маннитол при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь) хб	565 ± 177***	455 ± 78***	209 ± 16***	4,0 ± 0,0***	1/3
Группа 4.2 (n=3) (Двойная доза группы 4.1 (маннитол)) хб	354 ± 56***	300 ± 40***	166 ± 15***	4,0 ± 1,0***	3/3
Группа 4.3 (n=3) (Сукралоза при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь) хб	332 ± 42***	331 ± 41***	154 ± 49***	4,0 ± 1,0***	3/3
Группа 4.4 (n=3) (Двойная доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	309 ± 54***	277 ± 78***	136 ± 48***	3,0 ± 1,0***	3/3
Группа 4.5 (n=3) (0,5-кратная доза группы 4.1 (маннитол) + 0,5-кратная доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	332 ± 61***	360 ± 81***	149 ± 19***	2,0 ± 1,0***	3/3
Группа 4.6 (n=3) (доза группы 4.1 (маннитол) + доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	271 ± 52***	193 ± 34***	81 ± 18***	1,5 ± 1,0***	6/6
Группа 4.7 (n=3) (1,5-кратная доза группы 4.1 (маннитол) + 1,5-кратная доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	265 ± 53***	203 ± 24***	83 ± 25***	1,0 ± 1,0***	3/3
Группа 4.8 (n=3) (двойная доза группы 4.1 (маннитол) + двойная доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	227 ± 25***	159 ± 21***	69 ± 10***	0,5 ± 0,5***	6/6
Группа 4.9 (n=3) (140 мг/кг N-ацетилцистеина + 5 х (70 мг N-ацетилцистеина + двойная доза группы 4.1 (маннитол) + двойная доза группы 4.3 (сукралоза)) хб	233 ± 41***	171 ± 25***	58 ± 9***	0,3 ± 0,5***	6/6
Группа 5 (n=6) (Аэросил 200 при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь)	280 ± 98***	247 ± 43***	66 ± 18***	2,8 ± 1,0***	6/6

Группа 6 (n=6) (Гликолят крахмала натрия при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь)	294 ± 30***	248 ± 37***	81 ± 27***	2,7 ± 1,2***	6/6
Группа 7 (n=6) (Кросповидон при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь)	372 ± 90***	323 ± 40***	175 ± 61***	2,8 ± 1,5***	6/6
Группа 8 (n=6) (Микрокристаллическая целлюлоза при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь)	259 ± 36***	217 ± 28***	72 ± 21***	2,2 ± 1,0***	6/6
Группа 9 (n=6) (Повидон К-30 при дозе меньшей или эквивалентной 100 мг на каждую особь)	287 ± 38***	220 ± 53***	71 ± 26***	2,5 ± 1,0***	6/6

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005: сравнение экспериментальных групп с контрольной АПАФ

Результаты показывают, что поражения печени имели место в группе животных с гепатотоксичностью, вызванной АПАФ. В противоположность этому такие поражения печени могут быть устранены и выживаемость может быть повышена дозозависимым образом за счет использования маннитола и (или) сукралозы. В частности, комбинация маннитола и сукралозы позволяет достичь синергического действия; результаты аналогичны результатам группы нормального контроля и даже выше по сравнению с группой положительного контроля, в которой животные проходили курс стандартного лечения N-ацетилцистеином. Кроме того, было обнаружено, что другие ингредиенты, в том числе Аэросил 200, гликолят крахмала натрия, кросповидон, микрокристаллическая целлюлоза и повидон К-30 также являются более эффективными при лечении поражений печени по сравнению с группой положительного контроля, в которой животные проходили курс стандартного лечения N-ацетилцистеином. Такие высокие результаты также нашли свое отражение в соответствующих тканях печени.

На фиг. 4 представлены результаты гистологического анализа. Срезы тканей печени из группы крыс с гепатотоксичностью, вызванной АПАФ, показали, что гепатоциты, окружающие центральную вену, разорваны, имеют видимую вакуолизацию и уменьшенное число ядер, при этом некоторые гепатоциты даже проявили признаки некроза, в результате чего поражение печени является более серьезным по сравнению с гепатоцитами крыс в нормальной контрольной группе (фиг. 4В). С другой стороны, структура печени крыс в контрольной группе является нормальной, гепатоциты не повреждены и расположены упорядоченно без видимой вакуолизации (фиг. 4А). Что касается срезов печени животных из экспериментальной группы, прошедших лечение маннитолом и (или) сукралозой, гепатоциты являются относительно неповрежденными с видимыми ядрами и с меньшей степенью вакуолизации (фиг. 4D, E, F, G, H). В частности, комбинация маннитола и сукралозы позволяет достичь максимального защитного эффекта (фиг. 4G); результаты являются даже более высокими, чем в группе положительного контроля, в которой животные прошли стандартное лечение N-ацетилцистеином (фиг. 4С).

5.2.2 Маннитол эффективен при лечении повреждений печени, вызванных CCl₄

Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры функции печени				
Группы	GSP (мг/л)	AST (МЕ/л)	ALT (МЕ/л)	Общий индекс ИГА
Группа нормального контроля (n=10)	315 ± 48	88 ± 20	57 ± 17	0,0 ± 0,0
CCl ₄ контрольная группа (n=10)	914 ± 205***	815 ± 216***	770 ± 274***	6,2 ± 2,1***
Доза кемпферола меньшая или эквивалентная 100 мг на каждую особь (n=10)	456 ± 101***	198 ± 105***	128 ± 40***	4,3 ± 1,3*
Доза эпигаллокатехин-3-галлата меньшая или эквивалентная 100 мг на каждую особь (n=10)	312 ± 140***	144 ± 49***	95 ± 36***	1,7 ± 0,9***
Доза кверцетина меньшая или эквивалентная 100 мг на каждую особь (n=10)	286 ± 70***	115 ± 40***	93 ± 26***	1,1 ± 0,7***
Доза маннитола меньшая или эквивалентная 100 мг на каждую особь (n=10)	290 ± 78***	91 ± 28***	77 ± 22***	0,8 ± 0,5***

Статистический анализ: Дисперсный анализ (ANOVA) и метод наименьшей значимой разности (LSD).

***p<0,005, **p<0,01, *p<0,05, сравнение экспериментальных групп с контрольной группой, получавшей CCl₄.

Результаты демонстрируют, что поражение печени имело место в контрольной группе животных, получавших CCl_4 . В противоположность этому такое поражение печени может быть улучшено при использовании маннитола.

Пример 6. Анализ стеатоза печени

6.1 Материалы и методы

6.1.1 Клеточные линии и питательные среды для выращивания культур клеток

Была проанализирована активность различных ингредиентов в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, включая маннитол, сукралозу и другие соединения, для снижения удельной доли жировой ткани, используя клетки гепатомы человека линии HEP G2.

Для приготовления DMEM для клеточных культур №№ A-F, приведенных в табл. 4, использовали модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM) для выполнения последующих экспериментов.

Таблица 4. Приготовление модифицированной по способу Дульбекко среды Игла для клеточных культур №№ A-F

DMEM для клеточных культур	Методы приготовления
№ A	Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла растворяли в 1400 мл воды при помешивании, далее добавляли 2 г 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновой кислоты (HEPES) для образования раствора, к которому добавляли раствор бикарбоната натрия (4 г порошка бикарбоната натрия растворяли в 400 мл воды при помешивании), и доводили объем до 2000 мл водой. Значение pH полученного раствора было отрегулировано до $7,3 \pm 0,05$ путем добавления 5N HCl. После фильтрования через 0,2-мкм стерильную мембрану полученный раствор разливали в стерильные пенициллиновые флаконы и хранили при 4° C.
№ B	50 мл деактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 5 мл пирувата натрия (100 mM), 5 мл пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100 ед/мл) и 5 мл раствора заменимой аминокислоты для минимальной поддерживающей среды (MEM) (100X) добавляли к 450 мл модифицированной по способу Дульбекко среды Игла для клеточных культур № A.
№ C	5 мл пирувата натрия (100 mM), 5 мл пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100 ед/мл), и 5 мл раствора заменимой аминокислоты для минимальной поддерживающей среды (100X) добавляли к 450 мл модифицированной по способу Дульбекко среды Игла для клеточных культур № A.
№ D	Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла № B добавляли в олеатный/альбуминовый комплекс.
	Олеатный/альбуминовый комплекс приготавливали в соответствии со способом, представленным Van Harken et al. в 1969 г. (J Biol Chem. 1969 May 10; 244(9):2278-85). Способ предусматривал добавление к 25 мл модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № A 5 г альбумина телячьей сыворотки и далее 5 N раствора гидроксида натрия для регулирования уровня pH до 7,4 для приготовления смеси. Смесь далее помещали в ледяную ванну при 0° C для образования раствора альбумина телячьей сыворотки (BSA). Олеиновую кислоту растворяли в 50 мл спирта (95%) и далее титровали до конечной точки титрования, обнаружаемой с помощью фенолфталеина, с 1N раствором гидроксида натрия. Спирт выдували потоком гелия. Полученный олеат натрия растворяли в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № A при 37° C для образования раствора олеата натрия. На конечном этапе раствор альбумина телячьей сыворотки добавляли по каплям в раствор олеата натрия при помешивании для образования раствора комплекса олеат/альбумин.
№ E	Различные количества силимарина растворяли в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № C.
№ F	Различные количества испытуемых соединений настоящего изобретения растворяли в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № C.

Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла для клеточных культур №№ A-F хранили при 2-8° C и нагревали в водяной бане при 37° C до проведения экспериментов.

6.1.2 Определение числа клеток и тест на жизнеспособность клеток

Мертвые клетки поглощают 0,4% трипановый синий и приобретают синий цвет, в то время как живые клетки не пропускают определенные красители благодаря неповрежденной клеточной мембране и не окрашиваются. 100 мкл суспензии клеток и равного объема 0,4% трипанового синего равномерно перемешивали до образования смеси. Некоторую часть смеси (приблизительно 20 мкл) помещали в бороздку над камерой гемоцитометра, которую далее накрывали покровным стеклом для наблюдения под оптическим микроскопом. Живые клетки не были окрашены, в то время как мертвые клетки окрасились в синий цвет.

6.1.3 Индуцированное олеиновой кислотой образование жировых клеток печени из клеточной линии HEP G2

Клеточные линии HEP G2 (15×10^6 клеток) выращивали в модифицированной по способу Дульбекко

среде Игла для клеточных культур № В, инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч, культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № С (бессывороточная питательная среда) в течение 24 ч и на последнем этапе культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла для клеточных культур № D (содержащей комплекс олеат/альбумин) еще в течение 48 ч для индуцирования образования жировых клеток печени из клеточных линий HepG2.

6.1.4 Обработка каждой группы жировых клеток печени

Клеточные линии HepG2 были разделены на шесть групп, а именно: (1) холостую группу без обработки (лечения); (2) группу обработки диметилсульфоксидом: клетки из холостой группы обрабатывали диметилсульфоксидом; (3) контрольную группу: индуцирование олеиновой кислотой для образования жировых клеток печени; (4) группу, обрабатываемую носителем: жировые клетки печени, образованные индуцированием олеиновой кислотой, обрабатывали (лечили) диметилсульфоксидом; (5) группу положительного контроля: жировые клетки печени обрабатывали силимарином; и (6) тестовую группу: жировые клетки печени обрабатывали различными соединениями настоящего изобретения.

6.1.5 Определение триглицерида в клетках

После инкубирования в течение 72 ч подвергнутые лечению клетки из каждой группы последовательно дважды промывали в фосфатно-солевом буферном растворе и далее инкубировали в 0,5 мл трипсина/ЭДТА в течение 3 мин. Затем клетки соскабливали 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора и далее переносили в центрифужную пробирку для разрушения ультразвуком. Для определения содержания протеина был взят объем клеточных экстрактов в объеме 20 мкл. Определение триглицерида осуществляли, используя поставляемую на рынок комбинацию материалов (Randox). Полученное выше значение содержания триглицерида делили на значение содержания протеина для получения отношения, отражавшее относительное содержание триглицерида в клетках.

6.1.6 Животные для проведения экспериментов

Мыши линии B6, рекомендованные в Инструкции "Метод оценки эффективности защиты печени и оздоровления при здоровом питании", опубликованной Министерством здравоохранения Тайваня, были выбраны для испытаний на животных. Более четырех мышей использовали в каждой группе до проведения тестирования, при этом более двенадцати мышей использовали в каждой группе подтверждающего тестирования. Мыши-самцы, выращенные при температуре 23±2°C в виварии с 55±15% относительной влажностью при нормальном цикле дня и ночи (с 7:00 до 19:00 при включенном свете/с 19:00 до 7:00 при выключенном свете) и имеющие вес 18-23 г, были закуплены у компании "BioLASCO" (Тайвань) и размещены в Центре лабораторных животных в Медицинском центре национальной обороны. Испытания на животных проводили в соответствии с Руководством по проведению экспериментов на животных тайваньского Национального исследовательского института здравоохранения. Мышей кормили нормальным кормом по 3-5 г/сутки и не ограничивали их в питьевой воде в течение 1-2 недель и изучали состояние их здоровья. Вес мышей регистрировался один раз в неделю.

6.1.7 Распределение животных по группам

Испытуемые животные были произвольно распределены по группам: слепая контрольная группа, контрольная группа, получающая рацион с высоким содержанием жиров, группа положительного контроля и тестовая группа. Животные слепой контрольной группы получали обычный корм. Животные группы с рационом с высоким содержанием жиров получали корм с высоким содержанием жира. Животные группы положительного контроля получали корм с высоким содержанием жира и дополнительно через зонд силимарин (5 мг/кг/сутки). Животные тестовой группы получали корм с высоким содержанием жира и дополнительно через зонд испытуемые соединения.

6.1.8 Методы испытаний

Животных слепой контрольной группы кормили неупорядоченно нормальным кормом в течение 12 недель, в то время как животных группы с рационом с высоким содержанием жиров, группы положительного контроля и тестовой группы кормили неупорядоченно кормом с высоким содержанием жира в течение 12 недель. После 8 недель кормления животных слепой контрольной группы и группы с рационом с высоким содержанием жиров поили через зонд деионизированной водой один раз в сутки; животные группы положительного контроля получали через зонд силимарин один раз в сутки; и животные тестовой группы получали через зонд испытуемые соединения один раз в сутки в течение 4 или 8 недель.

До проведения испытаний и через восемь, двенадцать и шестнадцать недель после проведения испытаний у животных брали пробу крови из щеки или из сердца. По завершению испытаний всех мышей взвешивали, затем умерщвляли и одновременно брали пробу крови из щеки или из сердца. Пробы крови мышей выдерживали при комнатной температуре в течение одного часа до свертывания и затем сыворотку отделяли центрифугированием в морозильной центрифуге с максимальным ускорением 15700 g при 4°C в течение 5 мин. Затем с помощью автоматического биохимического анализатора крови определяли биохимические показатели функции печени, включая аспартат трансаминазу, аланинаминотрансферазу, триглицерид, общее содержание холестерина/общий счет (TCHO/TC), холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C) и холестерин липопротеинов высокой плотности. (HDL-C). Дополнительно из брюшной полости умерщвленных мышей были взяты образцы абдоминального жира и печени и взвеше-

ны для сравнения веса жира и печени с целью определения отношения веса печени к весу тела. Два тканевых блока объемом приблизительно 1 см срезали с большей правой доли печени, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали парафином для последующего изготовления срезов. Далее изготовленные срезы окрашивали гематоксилином-эозином для гистопатологического исследования. Кроме того, остальная часть печени была заморожена для сохранения и определения содержания триглицеридов и общего содержания холестерина в печени. Затем функции печени животных каждой группы были проанализированы с помощью Galactose Single Point Method (метод для оценки остаточной функции печени путем измерения концентрации галактозы в крови спустя 1 ч после ее введения (0,5 г/кг), который был признан и рекомендован для количественного определения остаточной функции печени в клиническом использовании Управлением США по надзору в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств и Министерством здравоохранения и социального обеспечения Тайваня. По завершении экспериментов внутривенно вводили 0,5 г галактозы (G.S.P.® 0,4 г/мл) на один килограмм веса животного. Через час после введения осуществляли отбор приблизительно 0,5 мл цельной крови с использованием фильтровальной бумаги для оценки функции печени мышей. Чем выше было значение GSP, тем хуже были остаточные функции печени. (Управление США по надзору в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств: "Отраслевая инструкция: фармакокинетика у пациентов с нарушением функций печени. План исследования, анализ данных и воздействие на дозирование и мечение" (Guidance for Industry: Pharmacokinetics in Patients with Impaired. Hepatic Function - Study Design, Data Analysis and Impact on Dosing and Labeling. 2003)).

6.1.9 Изготовление гистологических срезов ткани

По завершении экспериментов все мыши были умерщвлены. Срезали один тканевый блок с объемом приблизительно 1 см³ с большей правой доли печени, фиксировали в 10% растворе натурального формалина и далее дегидратировали и гиалинизировали в этаноле различной концентрации (30-50-70-95-99.5%) и ксилене.

Затем ксилен заменяли раствором горячего парафина. И, наконец, ткань была погружена в раствор парафина. Окончательный залитый в парафин препарат разделяли на парафиновые срезы толщиной 5 мкм с помощью микротом. Срезы перемещали на чистые лабораторные стекла, высушивали при 37°C и затем окрашивали гематоксилином и эозином.

6.1.10 Окрашивание срезов гематоксилином и эозином

Срезы ткани печени были распарафинированы в ксилене в течение 30 мин и далее последовательно регидратированы дважды в 99,5, 95, 70, 50 и 30% водном растворе этанола в течение 30 мин соответственно. Срезы могли быть окрашены после их выдерживания в дистиллированной воде в течение 10 мин. Срезы вначале погружали в гематоксин в течение 30 с для окрашивания ядра клетки, далее промывали дистиллированной водой в течение нескольких минут, окрашивали эозином в течение 2-5 мин и вновь промывали дистиллированной водой в течение нескольких минут. После завершения процесса окрашивания срезы были последовательно дважды дегидратированы в 50, 70, 95 и 100% водном растворе этанола в течение 30 с соответственно, гиалинизированы дважды в ксилене и, наконец, герметизированы и сохранены в среде для заключения ткани.

6.1.11 Гистопатологическое исследование

Для исследования изменений степени поражения, накопления жира, некроза или фиброза в клетках печени, когда имеет место текущее состояние поражения печени, ткани печени были окрашены гематоксилином и эозином для оценки степени накопления жира в печени. Все гистопатологические срезы были сделаны из одного и того же положения на большей правой доли печени для исключения системной ошибки при субъективном исследовании, и далее подвергнуты патологическому окрашиванию. Что касается оценки полуколичественного анализа в патологии, она должна быть подтверждена врачом или ветеринаром-патологом, прошедшем двойное слепое исследование для определения индекса активности (индекс активности неалкогольной жировой болезни печени) и сравнения всех срезов без знания плана проведения теста. И, наконец, дифференциальный анализ каждой группы проводили с использованием статистических методов.

6.1.12 Анализ антиоксидантной способности печени

Приблизительно 0,1 г ткани печени было взято у умерщвленного животного и гомогенизировано на центрифуге с биодробилкой-смесителем в течение 10 минут. К гомогенизированной ткани добавляли 9-кратное по весу количество буферного раствора (pH 7,4, 50 ммоль/л Трис-HCl, 180 ммоль/л KCl) добавляли к гомогенизированной ткани, затем смесь тщательно перемешивали Вортекс-миксером для дальнейшего использования. Полученный гомогенизированный раствор образцов ткани печени использовали для анализа различных элементов антиоксидантных систем печени, включая глутатион пероксидазу (GPx), глутатион (GSH), глутатион редуктазу (Grd) и супероксиддисмутазу (SOD). Методы соответствующего анализа можно найти в имеющейся литературе, например, проект документа "Метод оценки эффективности защиты печени и оздоровления при здоровом питании", опубликованный Министерством здравоохранения и социального обеспечения, Тайваня.

6.1.13 Статистический анализ

Все данные были выражены как среднее значение плюс/минус среднее квадратичное отклонение

(SD). Статистически значимое различие результатов анализа было определено путем расчета однофакторного дисперсионного анализа с использованием пакета программ обработки статистических данных для социальных наук, Версия 13, SPSS Inc. Далее были проведены многочисленные сравнения с использованием метода наименьшей достоверной разности в ретроспективном анализе для подтверждения значимого различия между группами. Среднее различие между группами оценивается как значимое при $p < 0,05$.

6.2 Результаты

6.2.1 Проведение экспериментов с клетками

Результаты проведенных экспериментов с клетками в отношении снижения содержания триглицерида в клетках HepG2, обнаруженного в группе положительного контроля (салимарин), приведены в табл. 5.

Таблица 5. Эффективность салимарина в отношении снижения содержания триглицерида в жировых клетках HepG2 группы положительного контроля

Концентрация салимарина (мкмоль)	Содержание триглицерида в клетках (мкг/мг протеина)	Степень снижения уровня триглицерида (%)
0 (Контрольная группа)	59,43 ± 4,60	-
1,0	44,17 ± 2,41	29 ± 8
5,0	44,59 ± 11,53	28 ± 10
10	26,38 ± 9,12	63 ± 11
100	20,48 ± 4,76	78 ± 5

Результаты снижения содержания триглицерида в жировых клетках HepG2, определенного с использованием постоянной концентрации испытуемых соединений, приведены в табл. 6. Исходя из полученных результатов, очевидно, что испытуемые соединения проявили различную степень действия при снижении содержания триглицерида в жировых клетках печени, сформированных из индуцированных HepG2 клеток, в условиях постоянной тестовой концентрации при сравнении с контрольной группой. Уравнение для расчета степени снижения уровня (%) триглицерида имеет следующий вид:

$$[1 - (\text{Содержание триглицеридов тестовой группы} - \text{Содержание триглицеридов слепой контрольной группы}) / (\text{Содержание триглицеридов в группе, индуцированное олеиновой кислотой} - \text{Содержание триглицеридов в контрольной группе})] \times 100\%$$

Таблица 6. Снижение содержания триглицеридов в жировых клетках печени за счет использования испытуемых соединений

Испытуемые вещества (1,0 мкМ)	Степень снижения уровня триглицеридов (%)
Салимарин - контроль	35,33 ± 1,96
Пуэрарин	49,91 ± 7,73
Флоридзин	42,35 ± 6,05
Дайдзеин	42,3 ± 5,34
Лаурилсульфат натрия	38,73 ± 4,65
Понцирин	38,12 ± 7,22
Синенситин	36,97 ± 4,84
(-)-Эпигаллокатехин	36,78 ± 6,67
Каемпферол	36,51 ± 4,78
Изовитексин	35,93 ± 3,35
Урсоловая кислота	35,86 ± 8,92
Эриодиктиол	35,11 ± 0,87
(+)-Лимонен	35,02 ± 10,04
Гесперидин	34,81 ± 5,25
Эргостерол	34,19 ± 3,69
β-мирцен	33,97 ± 11,22
(-)-Эпикатехин-3-галлат	32,7 ± 4,33
Гиперозид	30,51 ± 2,8
Силибин	30,26 ± 3,24
(+)-Катехин	29,57 ± 4,02
Формоноретин	29,55 ± 1,44
Этиловый эфир миристиновой кислоты	28,88 ± 3,91
Галангин	28,11 ± 8,62
Сукралоза	26,68 ± 2,93
Эйкозопентаеновая кислота (EPA)	26,15 ± 6,14
Морин	25,84 ± 10,65
Маннитол	22,35 ± 5,74
Сциадопитизин	21,83 ± 5,04
Вонгонин	20,78 ± 1,12
Дидимин	20,37 ± 12,69
Госсипин	20,25 ± 4,63
Сорбитол	20,06 ± 2,57
Лутеолин-7-глюкозид	19,33 ± 4,59
Повидон К-30	18,93 ± 5,13
Протокатеховая кислота	18,57 ± 7,6
(+)-Таксифолин	17,91 ± 8,35
Сахарин	17,53 ± 6,96
Умбеллиферон	17,4 ± 2,57
Глицерин	16,23 ± 4,25

Гесперитин	16,08	± 5,55
Нордигидрогваяретовая кислота	15,92	± 2,3
Транс-Коричная кислота	15,85	± 0,82
Бензоат натрия	14,35	± 4,86
Железа оксид красный	13,59	± 2,08
Неогесперидин	13,29	± 7,21
Нарингин	12,69	± 3,72
Диосмин	11,86	± 3,73
(-)-Эпикатехин	10,76	± 8,92
Глицирризин	10,55	± 7,4
Линарин	9,24	± 12,34
Байкалин	9,21	± 6,21
Кверцитрин	9,15	± 9,24
Ксилитол	7,36	± 6,34
Байкалеин	7,09	± 10,88
Лутеолин	6,95	± 15,23
Свертиамирин	6,72	± 11,04
Бутилированный гидроксанизол	6,21	± 3,8
Цикламат натрия	4,77	± 4,49
Ментол	66,24	± 1,87
Лимонная кислота	2,55	± 4,43
Лимонное масло	0,56	± 1,07
Прежелатинизированный крахмал	7,18	± 13,41
Сорбиновая кислота	2,03	± 1,96

Таблица 6-1. Часть испытуемых соединений из табл. 6, обеспечивших снижение содержания триглицеридов в жировых клетках печени

Испытуемые вещества (1,0 мкМ)	Степень снижения уровня триглицеридов (%)	
Пуэрарин	49,91	± 7,73
Флоридзин	42,35	± 6,05
Дайдзеин	42,3	± 5,34
Синенситин	36,97	± 4,84
(-)-Эпигаллокатехин	36,78	± 6,67
Каемпферол	36,51	± 4,78
Урсоловая кислота	35,86	± 8,92
Силимарин-контроль	35,33	± 1,96
(+)-Лимонен	35,02	± 10,04
Гесперидин	34,81	± 5,25
(-)-Эпикатехин-3-галлат	32,7	± 4,33
Силибин	30,26	± 3,24
Формоноретин	29,55	± 1,44
Этиловый эфир миристиновой кислоты	28,88	± 3,91
Эйкозапентаеновая кислота (ЕРА)	26,15	± 6,14
Вонгонин	20,78	± 1,12
Повидон К-30	18,93	± 5,13
Протокатеховая кислота	18,57	± 7,6
Умбеллиферон	17,4	± 2,57
Гесперитин	16,08	± 5,55
Нордигидрогваяретовая кислота	15,92	± 2,3
Неогесперидин	13,29	± 7,21
Нарингин	12,69	± 3,72
(-)-Эпикатехин	10,76	± 8,92
Глицирризин	10,55	± 7,4
Байкалин	9,21	± 6,21
Кверцитрин	9,15	± 9,24
Байкалеин	7,09	± 10,88

Таблица 6-2. Часть испытуемых соединений (биофлавоноиды) из табл. 6, обеспечивших снижение содержания триглицеридов в жировых клетках печени

Испытуемые вещества (1,0 мкМ)	Степень снижения уровня триглицеридов (%)	
Понцирин	38,12	± 7,22
Изовитексин	35,93	± 3,35
Эриодиктиол	35,11	± 0,87
Эргостерол	34,19	± 3,69
β-мирцен	33,97	± 11,22
Гиперозид	30,51	± 2,8
(+)-Катехин	29,57	± 4,02
Галангин	28,11	± 8,62
Морин	25,84	± 10,65
Сциадопитизин	21,83	± 5,04
Дидимин	20,37	± 12,69
Госипин	20,25	± 4,63
Лутеолин-7-глюкозид	19,33	± 4,59
(+)-Таксифолин	17,91	± 8,35
Транс-коричная кислота	15,85	± 0,82
Диосмин	11,86	± 3,73
Линарин	9,24	± 12,34
Ксилитол	7,36	± 6,34
Лутеолин	6,95	± 15,23
Свертиамирин	6,72	± 11,04

Таблица 6-3. Часть испытуемых соединений (вспомогательные вещества) из табл. 6, обеспечивших снижение содержания триглицеридов в жировых клетках печени

Испытуемые вещества (1,0 мкмоль)	Степень снижения уровня триглицеридов (%)
Лаурилсульфат натрия	38,73 ± 4,65
Сукралоза	26,68 ± 2,93
Маннитол	22,35 ± 5,74
Сорбитол	20,06 ± 2,57
Сахарин	17,53 ± 6,96
Глицерин	16,23 ± 4,25
Бензоат натрия	14,35 ± 4,86
Железа оксид красный	13,59 ± 2,08
Бутилированный гидроксанизол	6,21 ± 3,8
Цикламат натрия	4,77 ± 4,49
Ментол	66,24 ± 1,87
Лимонная кислота	2,55 ± 4,43
Лимонное масло	0,56 ± 1,07
Прежелатинизированный крахмал	7,18 ± 13,41
Сорбиновая кислота	2,03 ± 1,96

6.2.2 Эксперименты на животных

При проведении экспериментов на животных все животные получали корм, приводящий к развитию стеатоза печени, за исключением животных слепой контрольной группы, которых кормили нормальным кормом. Спустя восемь недель дополнительно к первоначальному корму животным каждой группы вводили различные вещества в течение четырех или восьми недель. Животные слепой контрольной группы и животные, получавшие рацион с высоким содержанием жиров, получали деионизированную воду; животные положительной группы получали силимарин; и животные тестовой группы получали различные испытуемые соединения, включающие пуэрарин, флоридзин, эриодиктиол, сукралозу, маннитол, сахарин, гесперитин, ментол и их сочетания.

6.2.2.1 Влияние на вес тела, вес печени и вес жира тела животных, оценка безопасности испытуемого соединения По результатам экспериментов на животных в табл. 7-1 и табл. 7-2 приведены данные о весе печени, весе жира тела и увеличении веса тела животных каждой группы.

Таблица 7-1. Результаты анализа веса печени и веса жира тела при приеме испытуемого соединения

Позиции	Вес абдоминального жира			Вес печени		
Ед./изм.	г			г		
Слепой контроль (n=13)	0,6	± 0,2	***	1,6	± 0,2	0,6
Рацион с высоким содержанием жиров (n=12)	2,8	± 0,4		1,6	± 0,4	2,8
Положительный контроль						
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	2,0	± 0,4	***	1,2	± 0,3	***
Силимарин 1,5 мг/кг (n=6)	2,3	± 0,5	*	1,5	± 0,1	
Единичное испытуемое соединение						
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	2,3	± 0,6	*	1,3	± 0,1	*
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	2,7	± 0,6		1,3	± 0,1	**
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	2,4	± 0,3		1,4	± 0,1	
Позиции	Вес абдоминального жира			Вес печени		
Ед./изм.	г			г		
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	2,1	± 0,6	**	1,5	± 0,2	
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	2,3	± 0,6	*	1,6	± 0,2	
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	2,4	± 0,3		1,4	± 0,1	
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	2,7	± 0,3		1,4	± 0,2	
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	2,0	± 0,3	***	1,4	± 0,2	
Сахарин 1,5 мг/кг (n=3)	2,3	± 0,5		1,5	± 0,1	
Пуэрарин 2,5 мг/кг (n=6)	2,8	± 0,3		1,4	± 0,2	
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	3,0	± 0,5		1,5	± 0,1	
Комбинации двух испытуемых соединений						
Сахарин + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	2,7	± 0,4		1,4	± 0,2	2,7
Ментол + Маннитол 4,5 мг/кг + 4,5 мг/кг (n=6)	3,0	± 0,5		1,6	± 0,3	3,0
Ментол + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	2,3	± 0,6		1,5	± 0,3	2,3
Комбинации трех испытуемых соединений						
Ментол + Маннитол + Эриодиктиол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг + 8 мг/кг (n=6)	2,6	± 0,6		1,4	± 0,2	2,6

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин	TG: содержание триглицеридов
Пуэрарин	ТС: общее содержание холестерина
Эриодиктиол	
Флоридзин	
Маннитол	
Ментол	
Сукралоза	
Сахарин	

Таблица 7-2. Результаты анализа увеличения веса тела, обусловленного приемом испытываемых соединений

Позиции	Увеличение веса тела	
Единица	г	
Слепой контроль (n=13)	15,6	± 7,9
Рацион с высоким содержанием жиров (n=12)	14,0	± 8,4
Положительный контроль		
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	10,2	± 12,7
Силимарин 1,5 мг/кг (n=6)	10,9	± 4,3
Единичное испытываемое соединение		
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	13,7	± 10,7
Позиции	Увеличение веса тела	
Единица	г	
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	8,3	± 6,7
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	8,3	± 5,4
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	17,0	± 5,6
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	19,6	± 5,0
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	10,3	± 8,5
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	11,1	± 7,7
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	10,9	± 7,4
Сахарин 1,5 мг/кг (n=3)	27,7	± 12,7 **
Пуэрарин 2,5 мг/кг (n=6)	21,7	± 3,1 *
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	14,5	± 8,3
Комбинации двух испытываемых соединений		
Сахарин + Маннитол		
1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	16,6	± 6,4
Ментол + Маннитол		
4,5 мг/кг + 4,5 мг/кг (n=6)	15,6	± 5,0
Ментол + Маннитол		
1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	14,9	± 6,3
Комбинации трех испытываемых соединений		
Ментол + Маннитол + Эриодиктиол		
1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	21,7	± 3,9 *

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин	TG: содержание триглицеридов
Пуэрарин	ТС: общее содержание холестерина
Эриодиктиол	
Флоридзин	
Маннитол	
Ментол	
Сукралоза	
Сахарин	

Результаты указывают на то, что вес абдоминального жира увеличивался у животных со стеатозом печени. Из числа испытываемых соединений, вводимых по отдельности, маннитол, ментол и сукралоза могут в значительной степени снизить вес абдоминального жира у животных.

Кроме того, в тестовой группе у животных не были обнаружены признаки какого-либо аномального состояния после введения испытываемого соединения. Ни одно из животных не погибло во время проведения экспериментов. По результатам исследований, проводимых при вскрытии умерщвленных животных по завершению экспериментов, не наблюдалось возникновения болезней или клинических симптомов, вызываемых испытываемыми соединениями. Таким образом, испытываемые соединения продемонстрировали свою безопасность при приеме.

6.2.2.2 Эффективность испытываемых соединений при снижении депонирования липидов в печени

На фиг. 5 показана мышь, у которой было индуцировано возникновение стеатоза печени и клетки печени которой около портальной зоны печени (включая желчевыводящие пути, воротную вену, печеночную артерию) были покрыты многочисленными крупными везикулярными жировыми каплями, при одновременном возникновении гепатоцеллюлярного баллонирования, и это указывает на то, что животная модель стеатоза печени была успешно создана путем индуцирования.

Результаты экспериментов на животных показали, что большое количество испытываемых соединений проявили действие в отношении снижения депонирования липидов в печени животных после их

введения в течение периода 4 недель или 8 недель.

Результаты приведены в табл. 8-1 и 8-2.

Таблица 8-1. Испытуемые соединения позволили снизить депонирование липидов в печени животных (период введения лекарственного вещества - 4 недели)

Позиции	Общее содержание триглицеридов в печени		Общее содержание холестерина в печени	
Единица	мг/г печени		мг/г печени	
Слепой контроль (n=13)	25,0	± 9,2 ***	2,5	± 0,4 ***
Рацион с высоким содержанием жиров (n=12)	132,0	± 69,2	6,6	± 3,5
Положительный контроль				
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	46,8	± 14,4 ***	3,0	± 0,9 ***
Силимарин 1,5 мг/кг (n=6)	69,9	± 32,3 **	3,7	± 0,4 **
Единичное испытуемое соединение				
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	48,9	± 14,1 ***	2,9	± 0,5 ***
Эриодиктиол 5,0 мг/кг (n=6)	54,2	± 15,0 ***	3,0	± 0,9 ***
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	43,1	± 13,1 ***	3,8	± 1,1 **
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	56,8	± 20,0 ***	5,0	± 0,9
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	68,9	± 37,5 **	3,0	± 0,9 ***
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	87,3	± 72,3 *	4,4	± 3,5 *
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	53,8	± 24,4 ***	4,7	± 1,2
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	71,5	± 45,5 ***	7,2	± 2,8
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	61,8	± 32,6 ***	3,4	± 0,6 ***
Сахарин 1,5 мг/кг (n=3)	84,0	± 41,4	2,8	± 1,5 **
Пуэарин 2,5 мг/кг (n=6)	89,4	± 49,1 *	6,7	± 2,7
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	67,8	± 16,6 ***	3,7	± 0,7 **
Комбинация двух испытуемых соединений				
Позиции	Общее содержание триглицеридов в печени		Общее содержание холестерина в печени	
Единица	мг/г печени		мг/г печени	
Сахарин + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	71,6	± 32,0 ***	8,5	± 2,5
Ментол + Маннитол 4,5 мг/кг + 4,5 мг/кг (n=6)	54,3	± 11,8 ***		
Ментол + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	31,0	± 11,2 ***	6,9	± 1,7
Ментол + Маннитол 1,5 мг/кг + 5 мг/кг (n=6)	96,6	± 77,4	5,9	± 1,7
Комбинация трех испытуемых соединений				
Ментол + Маннитол + Эриодиктиол 1,5 мг/кг + 5 мг/кг + 8 мг/кг (n=6)	83,1	± 50,9 *	6,0	± 2,3

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин
Пуэарин
Эриодиктиол
Флоридзин
Маннитол
Ментол
Сукралоза
Сахарин

TG: содержание триглицеридов
TC: общее содержание холестерина

Таблица 8-2. Испытуемые соединения обеспечили снижение содержания липидов в печени у животных (период приема - 8 недель)

Позиции	Содержание триглицеридов в печени		Содержание холестерина в печени	
Единица измерения	мг/г печени		мг/г печени	
Слепой контроль (n=7)	22,6	± 3,8 ***	3,8	± 0,4 ***
Рацион с высоким содержанием жиров (n=8)	187,3	± 91,2	12,1	± 7,3
Комбинации двух испытуемых соединений				
Сукралоза + Маннитол 7,5 мг/кг + 7,5 мг/кг (n=5)	115,3	± 36,2 *	6,0	± 3,0 **
Сукралоза + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=5)	144,4	± 59,9	6,0	± 1,2 *
Эриодиктиол + Маннитол 5,0 мг/кг + 7,5 мг/кг (n=4)	64,5	± 35,7 ***	3,6	± 1,1 ***
Эриодиктиол + Сукралоза 5,0 мг/кг + 7,5 мг/кг (n=6)	41,1	± 28,1 ***	2,8	± 1,0 ***
Комбинация трех испытуемых соединений				
Позиции	Содержание триглицеридов в печени		Содержание холестерина в печени	
Единица измерения	мг/г печени		мг/г печени	
Сукралоза + Маннитол + Эриодиктиол 7,5 мг/кг + 7,5 мг/кг + 2,5 мг/кг (n=6)	39,7	± 21,5 *	4,6	± 0,6 ***

Данные выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Эриодиктиол	TG: содержание триглицеридов
Маннитол	ТС: общее содержание холестерина
Сукралоза	

Результаты показали, что содержание триглицеридов и общее содержание холестерина повысились в печени мышей, у которых был индуцирован стеатоз печени. Из испытуемых соединений, вводимых по отдельности, гесперитин, пуэарин, эриодиктиол, флоридзин, маннитол, ментол и сукралоза способны в значительной степени снизить содержание триглицеридов в печени. В частности, отличный эффект, указывающий на приблизительно 67% снижение содержания триглицеридов в печени ($p < 0,005$), был достигнут после 4-недельного лечения эриодиктиолом. Кроме того, гесперитин, эриодиктиол, флоридзин, маннитол, ментол, сукралоза и сахарин способны в значительной степени снизить содержание холестерина в печени. В частности, отличный эффект, указывающий на приблизительно 56% снижение общего содержания холестерина в печени ($p < 0,005$), был достигнут после 4-недельного лечения сахарином.

После введения комбинации двух испытуемых соединений, а именно - комбинации сахараина и маннитола, комбинации ментола и маннитола, комбинации сукралозы и маннитола, комбинации эриодиктиола и маннитола или комбинации эриодиктиола и сукралозы обеспечивалось значительное снижение содержания триглицеридов в печени. В частности, отличный эффект, указывающий на приблизительно 77% снижение содержания триглицеридов в печени ($p < 0,005$), был достигнут после 4-недельного лечения комбинацией ментола и маннитола; и отличный эффект, указывающий на приблизительно 78% снижение содержания триглицеридов ($p < 0,005$) в печени, был достигнут после 8-недельного лечения комбинацией эриодиктиола и сукралозы. Кроме того, комбинация сукралозы и маннитола, комбинация эриодиктиола и маннитола или комбинация эриодиктиола и сукралозы могут в значительной степени снизить общее содержание холестерина, при этом следует отметить, что отличный эффект, указывающий на приблизительно 77% снижение общего содержания холестерина в печени ($p < 0,005$) был достигнут после 8-недельного лечения комбинацией эриодиктиола и сукралозы.

После введения комбинации трех испытуемых соединений комбинация ментола, маннитола и эриодиктиола или комбинация сукралозы, маннитола и эриодиктиола позволили в существенно снизить содержание триглицеридов в печени. В частности, отличный эффект, указывающий на приблизительно 79% снижение содержания триглицеридов в печени ($p < 0,005$), был достигнут после 8-недельного лечения комбинацией сукралозы, маннитола и эриодиктиола. Кроме того, комбинация сукралозы, маннитола и эриодиктиола позволили в значительной степени снизить общее содержание холестерина в печени.

6.2.2.3 Эффективность испытуемых соединений для снижения поражения печени

6.2.2.3.1 Действие соединений на снижение количества жира печени и поражение печеночной ткани

Результаты экспериментов на животных показали, что многие испытуемые соединения проявили эффективность в снижении количества жира печени и поражении печеночной ткани в ходе проведения 4-недельного эксперимента. На фиг. 5 показана пораженная почечная ткань животных со стеатозом печени. Поражение печеночной ткани характеризовалось многочисленными везикулярными жировыми каплями, покрывающими клетки печени около портальной зоны печени (включая желчевыводящие пути, воротную вену, печеночную артерию), и гепатоцеллюлярным баллонированием. Для сравнения после лечения силимарином, ментолом, эриодиктиолом или маннитолом в течение 4 недель произошло значительное сокращение крупных везикулярных жировых капель в клетках печени в срезах печеночной ткани. Часть мелких разбитых капель все еще наблюдалась у мышей, которым вводили силимарин, но печеночная ткань у мышей, получавших ментол, эриодиктиол или маннитол, имела большее сходство с печеночной тканью животных в контрольной группе, указывая на наличие легкой степени заболевания стеатозом печени. Кроме того, результат индекса активности неалкогольной жировой болезни печени (NAS) приведен в табл. 9.

Таблица 9. Способность испытуемых соединений облегчить состояние поражения печени у животных

Позиции	NAS		
Единица измерения	мг/г печени		
Слепой контроль (n=13)	0,7	$\pm$ 0,5	***
Рацион с высоким содержанием жиров (n=12)	3,3	$\pm$ 1,7	
Положительный контроль			
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	0,8	$\pm$ 0,4	***
Силимарин 1,5 мг/кг (n=6)	1,5	$\pm$ 0,8	*
Единичное испытуемое соединение			

Позиции	NAS		
Единица измерения	мг/г печени		
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	1,8	± 1,0	
Эриодиктиол 5,0 мг/кг (n=6)			
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	1,5	± 0,8	*
Эриодиктиол 7,5 мг/кг (n=6)	1,8	± 1,1	
Эриодиктиол 1,5 мг/кг (n=6)	1,8	± 2,0	
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	1,8	± 1,6	
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	1,7	± 0,8	*
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	2,7	± 1,9	
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	1,3	± 0,8	*
Сахарин 1,5 мг/кг (n=3)			
Пуэарин 2,5 мг/кг (n=6)			
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	1,7	± 0,5	
Комбинации двух испытуемых соединений			
Сахарин + Маннитол			
1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)			
Ментол + Маннитол	2,2	± 1,5	
4,5 мг/кг + 4,5 мг/кг (n=6)			
Ментол + Маннитол			
1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	0,7	± 0,5	***
Ментол + Маннитол	2,5	± 1,8	
.5 мг/кг + .5 мг/кг (n=6)			
Комбинация трех испытуемых соединений			
Ментол + Маннитол + Эриодиктиол			
.5 мг/кг + .5 мг/кг + .8 мг/кг (n=6)	2,0	± 1,4	

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин
Пуэарин
Эриодиктиол
Флоридзин
Маннитол
Ментол
Сукралоза
Сахарин

Индекс активности неалкогольной жировой болезни печени (NAS) указывал на индекс активности неалкогольной жировой болезни печени [Hepatology. 2005 Jun;41(6):1313-21], и в полном объеме позволял оценить степень стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов. Перечень индексов приведен в табл. 10. Более высокий индекс указывает на серьезное поражение печени.

Таблица 10. NAS Проект по оценке индекса активности неалкогольной жировой болезни печени

Позиции	Индекс	Степень поражения	Определение и описание
Стеатоз	0	<5%	Относится к размеру площади зоны, пораженной стеатозом в соответствии с оценкой на основании исследования при малом-среднем увеличении; легкая степень стеноза (5%) получает индекс 0 с целью предотвращения придания избыточного веса биопсии при исключительно слабо выраженном жировом перерождении
	1	5-33%	
	2	>33-66%	
	3	>66%	
Лобулярное воспаление	0	Отсутствие очагов	Ацидофильные организмы не включены в данную оценку, равно как и портальное воспаление
	1	<2 очагов /200х	
	2	2-4 очага /200х	
	3	>4 очага /200х	
Баллонирование гепатоцитов	0	Отсутствует	
	1	Несколько клеток, подвергшихся баллонной дистрофии	Термин "несколько" означает редкие, но определенные подвергшиеся баллонной дистрофии гепатоциты, а также случаи, являющиеся пограничными с точки зрения диагностики
	2	Баллонирование многих клеток / ярко выраженное баллонирование	Большинство случаев с ярко выраженным баллонированием также характеризовались гиалином Мэллори, однако гиалину Мэллори отдельно не присуждается индекс в отношении оценки индекса активности неалкогольной жировой болезни печени.

Результаты показали, что поражение печеночной ткани имело место у мышей, у которых был вызван стеатоз печени (повышение оценки индекса активности неалкогольной жировой болезни печени). Из вводимых по отдельности испытуемых соединений эриодиктиол и маннитол способны в значительной степени уменьшить поражение печени. Примечательно, что при введении комбинации двух соеди-

нений комбинация ментола и маннитола позволяла достичь отличного эффекта. Не было обнаружено ни малейших признаков поражения печени. Индекс активности неалкогольный жировой болезни был аналогичен индексу контрольной группы.

6.2.2.3.2 Эффект устранения дисфункции печени

Результаты экспериментов на животных показали, что большинство испытуемых соединений продемонстрировали эффективность устранения дисфункции печени у животных в течение 4 или 8-недельного периода введения соединений. Результаты приведены в табл. 11-1 и табл. 11-2.

Таблица 11-1. Испытуемые соединения способны устранить дисфункцию печени у животных (период введения - 4 недели)

Позиции	аланинаминотрансфераза аспартаттрансаминаза					
Единица измерения	Единиц на литр			Единиц на литр		
Слепой контроль (n=13)	32,6	± 16,1	***	112,2	± 53,9	***
Рацион с высоким содержанием жиров (n=12)	70,1	± 45,2		156,8	± 100,8	
Положительный контроль						
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	33,9	± 9,3	***	168,1	± 42,6	
Силимарин 1,5 мг/кг (n=6)	43,8	± 18,7	*	153,6	± 62,5	
Единичное испытуемое соединение						
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	25,0	± 10,8	***	63,3	± 7,7	***
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	44,5	± 15,9	*	107,6	± 54,3	
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	40,8	± 11,4	*	187,2	± 142,1	
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	32,3	± 10,1	**	74,3	± 18,6	**
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	30,9	± 16,8	***	127,0	± 31,2	
Эриодиктиол 5,0 мг/кг (n=5)	41,4	± 6,3	*	161,4	± 42,3	
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	33,7	± 18,5	***	100,9	± 42,0	
Пуэрарин 2,5 мг/кг (n=6)	34,4	± 14,7	***	66,9	± 8,5	***
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	35,7	± 9,1	***	161,9	± 96,2	
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	36,8	± 22,1	**	72,4	± 11,2	***
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	41,5	± 13,7	*	129,9	± 37,1	
Сахарин 1,5 мг/кг (n=3)	50,7	± 29,7		170,4	± 28,6	
Комбинации двух испытуемых соединений						
Ментол + Маннитол .5 мг/кг + .5 мг/кг (n=6)	23,9	± 17,8	***	60,4	± 8,2	***
Ментол + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	16,7	± 4,3	***	59,8	± 7,5	***
Сукралоза + Маннитол 7,5 мг/кг + 7,5 мг/кг (n=6)	45,5	± 15,2		91,4	± 21,8	*
Сукралоза + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	52,4	± 34,0		92,1	± 23,0	*
Эриодиктиол + Маннитол 5,0мг/кг + 7,5мг/кг (n=4)	43,4	± 10,5		151,0	± 54,2	
Эриодиктиол + Сукралоза 5,0мг/кг + 7,5мг/кг (n=4)	38,2	± 10,9	*	143,8	± 67,6	
Сахарин + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=6)	51,7	± 54,2		70,0	± 27,6	***
Комбинация трех испытуемых соединений						
Ментол + Маннитол + Эриодиктиол .5 мг/кг + .5 мг/кг + .8 мг/кг (n=6)	21,2	± 8,7	***	54,8	± 13,2	***
Данные выражены как среднее значение±стандартное отклонение. Статистическое различие определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности обозначалось						
Позиции	аланинаминотрансфераза аспартаттрансаминаза					
Единица измерения	Единиц на литр			Единиц на литр		
словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.						
Гесперитин	ALT: аланинаминотрансфераза AST: аспартаттрансаминаза					
Пуэрарин						
Гесперитин						
Пуэрарин						
Эриодиктиол						
Флоридзин						
Маннитол						
Ментол						
Сукралоза						
Сахарин						

Таблица 11-2. Испытуемые соединения способны устранить дисфункцию печени у животных (период введения - 8 недель)

Позиции	аланинаминотрансфераза		аспартаттрансаминаза	
Единица измерения	Единиц на литр		Единиц на литр	
Слепой контроль (n=7)	65,1	± 21,5 ***	22,6	± 4,3 ***
Рацион с высоким содержанием жиров (n=8)	111,0	± 26,2	109,4	± 46,4
Комбинации двух испытуемых соединений				
Сукралоза + Маннитол 7,5 мг/кг + 7,5 мг/кг (n=5)	92,4	± 16,5	49,5	± 14,4 ***
Сукралоза + Маннитол 1,5 мг/кг + 1,5 мг/кг (n=4)	112,5	± 23,8	93,0	± 26,0
Комбинация трех испытуемых соединений				
Сукралоза + Маннитол + Эриодиктиол 7,5 мг/кг + 7,5 мг/кг + 2,5 мг/кг (n=6)			40,0	± 12,2 ***

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности словами. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Маннитол
Сукралоза

ALT: аланинаминотрансфераза
AST: аспартаттрансаминаза

Аланинаминотрансфераза и аспартаттрансаминаза наиболее широко используются в качестве ферментных индикаторов для отражения биохимической дисфункции печени. При нормальных условиях указанные ферменты присутствуют в клетках печени. Однако при повреждении клеток печени происходит утечка ферментов.

Повышение значений уровня аланинаминотрансферазы и аспартаттрансаминазы в сыворотке в целом указывает на воспаление печени и дисфункцию печени.

Результаты показали, что животные, у которых было индуцировано заболевание стеатозом печени (повышение значений аланинаминотрансферазы и аспартаттрансаминазы), страдали от дисфункции печени. Из всех вводимых по отдельности испытуемых соединений гесперитин, пуэарин, эриодиктиол, флоридзин, маннитол, ментол, сукралоза и сахарин обеспечивали значительное снижение значений аланинаминотрансферазы и аспартаттрансаминазы. В частности, обеспечивался отличный эффект, указывающий на приблизительно 64% снижение значения аланинаминотрансферазы ($p < 0,005$) и приблизительно 60% снижение аспартаттрансаминазы ($p < 0,005$) после 4-недельного лечения маннитолом.

При введении комбинации двух испытуемых соединений как комбинация ментола и маннитола, так и комбинация эриодиктиола и сукралозы позволяли значительно уменьшить значение аланинаминотрансферазы. Комбинация ментола и маннитола, комбинация сукралоза и маннитола или комбинация сахараина и маннитола также позволяла существенно снизить значение аспартаттрансаминазы. В частности, отличный эффект, указывающий на приблизительно 76% снижение значения аланинаминотрансферазы ($p < 0,005$) и приблизительно 62% снижение значения аспартаттрансаминазы ($p < 0,005$) может быть достигнут после 4-недельного лечения комбинацией ментола и маннитола.

При введении комбинации трех испытуемых соединений комбинация сукралозы, маннитола и эриодиктиола были способны значительно снизить значение аланинаминотрансферазы ($p < 0,005$).

6.2.2.4 Способность испытуемых соединений повысить оксидантную активность печени

Результаты экспериментов на животных продемонстрировали, что большинство испытуемых соединений проявляли эффективность в повышении оксидантной активности печени у животных в течение 4-недельного периода проведения экспериментов. Результаты приведены в табл. 12-1 и табл. 12-2.

Таблица 12-1. Способность испытуемых соединений повысить оксидантную активность печени у животных (глутатионпероксидаза (GPx) и глутатион (GSH))

Позиции	Глутатионпероксидаза		Глутатион	
Единица измерения	Единиц на литр		Единиц на литр	
Слепой контроль (n=10)	2588,0	± 524,5	1224,1	± 95,5
Рацион с высоким содержанием	2252,5	± 395,2	1193,0	± 203,8

Позиции	Глутатионпероксидаза		Глутатион	
Единица измерения	Единиц на литр		Единиц на литр	
жиров (n=8)				
Положительный контроль				
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	3358,3	± 1205,3 ***	1398,8	± 396,5
Единичное испытуемое соединение				
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	3738,3	± 665,1 ***	2147,7	± 459,1 ***
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	3423,3	± 547,8 ***	1605,1	± 305,9 **
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	2580,0	± 555,2	1502,5	± 276,9 *
Пуэрарин 2,5 мг/кг (n=6)	3581,7	± 1056,7 ***	1498,1	± 150,0 *
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	3334,0	± 377,7 **	1609,1	± 201,1 **
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	2995,0	± 651,1 *	1448,0	± 281,5
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	3234,0	± 505,1 **	1387,7	± 168,2
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	3133,3	± 376,9 *	1742,6	± 241,5 ***
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	3083,3	± 378,9 **	1302,0	± 241,1
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	2921,7	± 640,2	1432,7	± 104,0

Данные выражены как среднее значение±стандартное отклонение. Статистическое различие, определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности, обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин
Пуэрарин
Гесперитин
Пуэрарин
Эриодиктиол
Флоридзин
Маннитол
Ментол
Сукралоза

Grx: глутатион пероксидаза
GSH: глутатион

Таблица 12-2. Испытуемые соединения способны повысить антиоксидантную активность печени у животных (Grd и SOD)

Позиции	Глутатион редуктаза		Супероксиддисмутаза	
Единица измерения	Единиц на литр		Единиц на литр	
Слепой контроль (n=10)	123,5	± 30,9	380,3	± 38,8
рацион с высоким содержанием жиров (n=8)	82,1	± 21,7	371,7	± 49,3
Положительный контроль				
Силимарин 5,0 мг/кг (n=6)	88,9	± 29,2	435,9	± 59,2 *
Единичное испытуемое соединение				
Маннитол 7,5 мг/кг (n=6)	117,6	± 32,0 **	462,8	± 52,8
Позиции				
Единица измерения				
Маннитол 4,5 мг/кг (n=6)	110,1	± 18,4 *	429,2	± 85,2
Маннитол 1,5 мг/кг (n=6)	95,3	± 22,1	367,3	± 35,6
Пуэрарин 2,5 мг/кг (n=6)	99,0	± 17,2	434,5	± 59,8
Сукралоза 7,5 мг/кг (n=6)	90,4	± 17,2	399,0	± 34,5
Сукралоза 1,5 мг/кг (n=6)	100,0	± 18,6	373,0	± 50,4
Флоридзин 2,5 мг/кг (n=6)	82,2	± 33,6	411,5	± 87,5
Гесперитин 2,5 мг/кг (n=6)	102,5	± 28,3	408,3	± 66,7
Эриодиктиол 2,5 мг/кг (n=6)	86,9	± 15,7	385,9	± 34,0
Ментол 1,5 мг/кг (n=6)	95,2	± 16,2	427,9	± 41,9

Данные выражены как среднее значение±стандартное отклонение. Статистическое различие определенное методом дисперсного анализа и наименьшей значимой разности обозначалось словами. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 в сравнении с рационом с высоким содержанием жиров.

Гесперитин
Пуэрарин
Гесперитин
Пуэрарин
Эриодиктиол
Флоридзин
Маннитол
Ментол
Сукралоза

Grd: Глутатион редуктаза
SOD: Супероксиддисмутаза

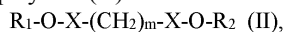
Глутатион пероксидаза (Grx), глутатион (GSH), глутатион редуктаза (Grd) и супероксиддисмутаза (SOD) являются широко известными элементами антиоксидантных систем печени, способными снизить оксидативный стресс в печени и предотвратить поражение печени, вызываемое оксидативным стрессом.

Повышение значений глутатион пероксидазы, глутатиона, глутатион редуктазы и супероксиддисмутазы указывает на сохранение более высокой антиоксидантной активности.

Результаты продемонстрировали, что антиоксидантная активность печени мышей, у которых было индуцировано заболевание стеатозом печени, была снижена. Из вводимых по отдельности испытуемых соединений гесперитин, пуэрарин, эриодиктиол, флоридзин, маннитол и сукралоза способствовали значительному повышению антиоксидантной активности. В частности, был достигнут отличный эффект значительного повышения уровней глутатион пероксидазы, глутатиона, глутатион редуктазы и супероксиддисмутазы ($p < 0,005$) после 4-недельного лечения маннитолом. В итоге подвергнутые испытанию соединения, включая маннитол и сукралозу и другие соединения, способны снизить жировые отложения в печени, уменьшить поражение печени и улучшить антиоксидантную активность печени. Была подтверждена безопасность указанных соединений путем проведения экспериментов на животных, и было обнаружено, что они обладают потенциалом, обеспечивающим разработку на их основе продуктов диетического питания или лекарственных средств для уменьшения печеночного жира или ослабления симптомов сопутствующих заболеваний, таких как жировые болезни печени, острая и хроническая алкогольная жировая болезнь печени, острая и хроническая неалкогольная жировая болезнь печени (неалкогольная жировая болезнь печени), острый и хронический алкогольный гепатит, острый и хронический неалкогольный стеатогепатит, неалкогольный цирроз и алкогольный цирроз (ICD-9-CM коды диагноза: 571.8, 571.0, 571.1, 571.2, 571.3, 571.4, 571.5, 571.9).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное формулой (II)



где X обозначает $C=O$;

R_1 и R_2 являются одинаковыми или различными, выбранными из группы, включающей водород, полиоловую группу и сахаридную группу (G)_p, причем полиоловая группа является $-CH_2(CHON)_nCH_2OH$, где n обозначает целое число от 1 до 18, G обозначает моносахаридный остаток и p обозначает целое число от 1 до 2, при этом по меньшей мере одна из гидроксильных групп в (G)_p замещена атомом галогена, при этом, когда R_1 является водородом, то R_2 не является водородом; и

m обозначает целое число от 1 до 7,

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, в котором две или несколько гидроксильных групп в (G)_p замещены атомами галогена.

3. Соединение по п.1, в котором остаток моносахарида является гексозой.

4. Соединение по п.3, в котором гексоза выбрана из группы, включающей альдогексозу и кетогексозу.

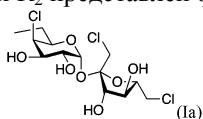
5. Соединение по п.1, в котором R_1 или R_2 являются сахаридной группой, представленной $-G_1-O-G_2$, при этом G_1 и G_2 являются одинаковыми или различными, выбранными из группы, включающей альдогексозу и кетогексозу, и по меньшей мере одна из гидроксильных групп в G_1 или по меньшей мере одна из гидроксильных групп в G_2 замещена атомом галогена.

6. Соединение по п.5, в котором атом галогена выбран из группы, включающей хлор, бром и йод.

7. Соединение по п.6, в котором атом галогена является хлором.

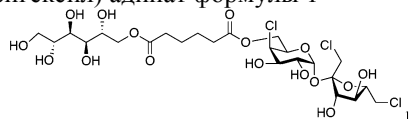
8. Соединение по п.5, в котором G_1 является глюкозой, при этом одна из гидроксильных групп замещена хлором; и G_2 является фруктозой, при этом две из гидроксильных групп замещены хлором.

9. Соединение по п.5, в котором R_1 или R_2 представлен формулой (Ia)

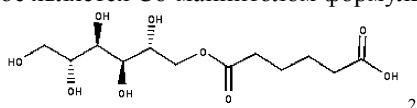


10. Соединение по п.5, в котором m и n обозначают 4.

11. Соединение по п.1, представляющее собой ((2R,3R,4R,5R,6R)-6-(((2R,5R)-2,5-бис(хлорметил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)окси)-3-хлор-4,5-дигидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил ((2R,3R,4R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил) адипат формулы 1



12. Соединение по п.1, которое является С6-маннитолом формулы 2



13. Соединение по п.1, в котором R_1 выбран из группы, включающей сахаридную группу (G)_p, R_2

выбран из группы, включающей водород, полиоловую группу и сахаридную группу (G)_p, причем полиоловая группа является $-CH_2(CHOH)_nCH_2OH$, где n обозначает целое число от 1 до 18, G обозначает моносахаридный остаток и p обозначает целое число от 1 до 2, где по меньшей мере одна из гидроксильных групп в (G)_p замещена атомом галогена и m обозначает целое число от 1 до 2, или его фармацевтически приемлемую соль.

14. Соединение по п.1, в котором R_1 и R_2 выбраны из группы, включающей полиоловую группу, причем полиоловая группа является $-CH_2(CHOH)_nCH_2OH$, где n обозначает целое число от 1 до 18 и m обозначает целое число от 1 до 2, или его фармацевтически приемлемую соль.

15. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения гепатотоксичности, включающая соединение по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемую соль в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

16. Способ профилактики или лечения гепатотоксичности у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемой соли.

17. Способ по п.16, в котором соединение по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными веществами, выбранными из группы, включающей микрокристаллическую целлюлозу, маннитол, сукралозу, кросповидон, гликолят крахмала натрия, Аэросил 200, ментол, поливинилпирролидон и N-ацетилцистеин и их любое сочетание.

18. Способ по п.17, в котором одно или несколько дополнительных веществ выбраны из группы, включающей ментол, маннитол, сукралозу, N-ацетилцистеин и их любое сочетание.

19. Способ по п.16, в котором гепатотоксичность вызвана лекарственными препаратами, CCl_4 или липидом.

20. Способ по п.19, в котором лекарственным препаратом является ацетаминофен.

21. Способ профилактики или лечения стеатоза печени или улучшения течения болезни печени, вызванной стеатозом печени, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемой соли.

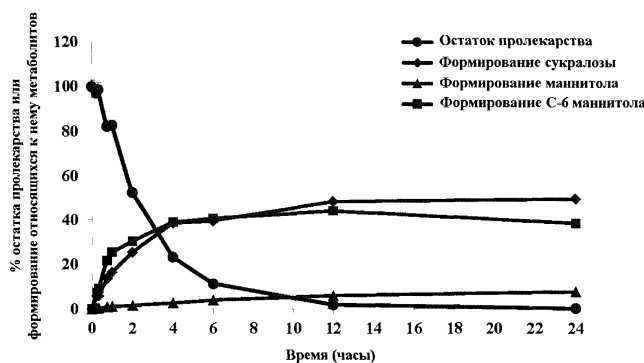
22. Способ по п.21, в котором соединение по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными веществами, выбранными из группы, включающей ментол, сукралозу, маннитол, эриодиктиол, пуэарин, флоридзин, гесперитин, сахарин и любые их сочетания.

23. Способ по п.22, в котором одно или несколько дополнительных веществ выбраны из группы, включающей (1) комбинацию сахараина и маннитола, (2) комбинацию ментола и маннитола, (3) комбинацию сукралозы и маннитола, (4) комбинацию эриодиктиола и маннитола, (5) комбинацию эриодиктиола и сукралозы, (6) комбинацию ментола, маннитола и эриодиктиола и (7) комбинацию сукралозы, маннитола и эриодиктиола.

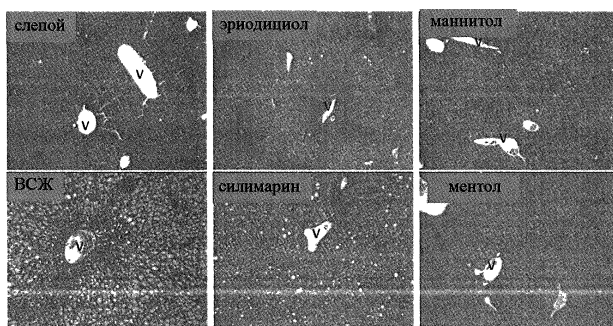
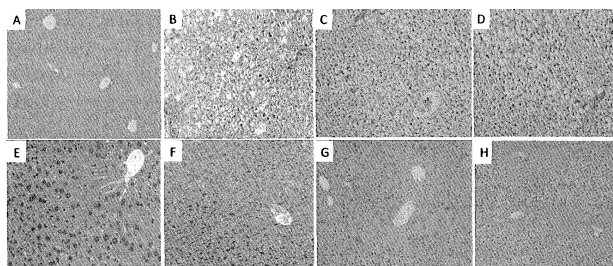
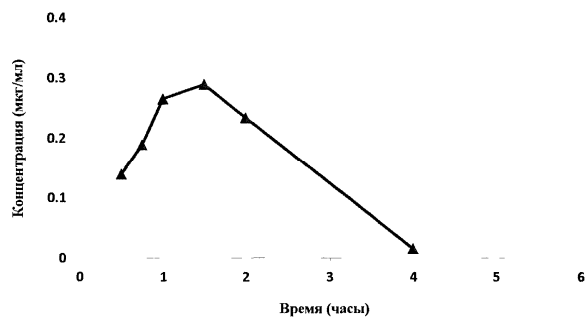
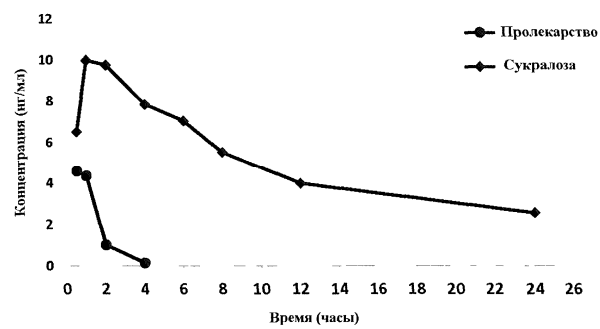
24. Способ по любому из пп.17, 18, 22 и 23, в котором соединение по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько дополнительных веществ вводят одновременно или последовательно.

25. Применение соединения по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для профилактики или лечения гепатотоксичности.

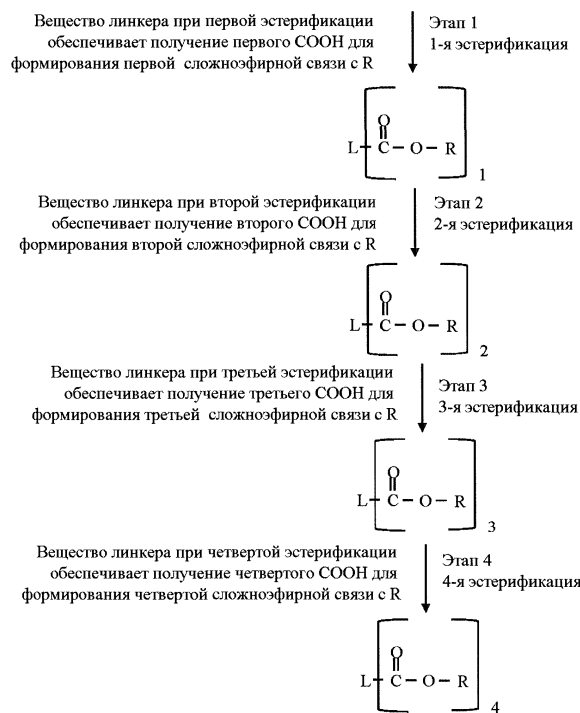
26. Применение соединения по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для профилактики или лечения стеатоза печени, или улучшения течения болезни печени, вызванной стеатозом печени.



Фиг. 1



Вещество линкера, обеспечивающее создание одного или более $\text{COOH} + \text{R-OH}$ для проведения эстерификации



Фиг. 6

