



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07C 59/42	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C07C 59/58	(2006.01)	A61P 9/10	(2006.01)
C07C 57/12	(2006.01)	A61P 9/12	(2006.01)
C07C 57/52	(2006.01)	A61P 3/04	(2006.01)
C07C 229/30	(2006.01)	A61P 17/00	(2006.01)
C07C 323/54	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
A61K 31/201	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/185	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
A23L 1/30	(2006.01)	A61P 3/00	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)		

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011128335/04, 04.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.12.2008 ES P200803480

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2013 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 20.10.2014 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CAS Regisrty Number 760938-73-6, 434938-02-0.STNInternational,Columbus,Ohio . CAS Regisrty Number 155056-28-3.STN International, Columbus, Ohio . CAS Regisrty Number 339170-34-2, 339170-33-1, 56472-30-1. STN International, Columbus, Ohio . WO 2003030891A1, 17.04.2003. WO 2005041691A1, 12.05.2005 . Alemany R.et al, 2-Hydroxyoleic Acid: A New (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.07.2011

(86) Заявка РСТ:
ES 2009/070561 (04.12.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/066931 (17.06.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр.
3, ООО "Юридическая фирма "Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭСКРИБА РУИС Пабло Висенте (ES),
БУСКЕТС КСАУБЕТ Ксавьер (ES),
БАРСЕЛО КОБЛИХН Гвендолин (ES),
ЛЬАДО КАНЬЕЛЬАС Виктория (ES),
АЛЬВАРЕС МАРТИНЕС Рафаэль (ES),
ТЕРЕС ХИМЕНЕС Сильвия (ES),
ЛОПЕС Даниэль (ES),
БАРСЕЛО ЭСТАРЕЛЬАС Хуана (ES),
ТЕЙЛОР ГРИН Хулиан (ES),
АВИЛА МАТИН Херардо (ES)

(73) Патентообладатель(и):

УНИВЕРСИТАТ ДЕ ЛЕЗ ИЛЬ БАЛЕАР
(ES)

(54) АЛЬФА-ПРОИЗВОДНЫЕ ЦИС-МОНОНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к новым соединениям формулы I:

цис-COOR-XCH-(CH₂)_a-CH=CH-(CH₂)_b-CH₃,

в которой (a) и (b) могут принимать любое

значение от 0 до 14, (X) выбирают из: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ и CH₃COO, и (R) представляет собой натрий (Na), применяемым для профилактики и/или

терапевтического лечения ожирения, гипертензии и/или рака. Также изобретение относится к применению соединений формулы I для приготовления фармацевтической и/или нутрицевтической композиции, к фармацевтической и/или нутрицевтической композиции на основе соединений формулы I, к

косметическому, не терапевтическому, способу улучшения кожных проявлений и к способу для профилактики и/или терапевтического лечения заболеваний у людей и животных с использованием соединений формулы I. 5 н. и 13 з.п. ф-лы, 22 ил., 5 табл., 9 пр.

(51) МПК (продолжение)

(56) (продолжение):

Hypotensive Molecule. Hypertension, 2004, 43, 249-254. SU 1098539A1, 23.06.1984. Escriba P.V.

Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. Trends in Molecular Medicine, 2006, 12(1), 34-43

R U 2 5 3 1 3 5 3 C 2

R U 2 5 3 1 3 5 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 531 353** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

<i>C07C</i>	<i>59/42</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>35/00</i>	(2006.01)
<i>C07C</i>	<i>59/58</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>9/10</i>	(2006.01)
<i>C07C</i>	<i>57/12</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>9/12</i>	(2006.01)
<i>C07C</i>	<i>57/52</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>3/04</i>	(2006.01)
<i>C07C</i>	<i>229/30</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>17/00</i>	(2006.01)
<i>C07C</i>	<i>323/54</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>25/28</i>	(2006.01)
<i>A61K</i>	<i>31/201</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>29/00</i>	(2006.01)
<i>A61K</i>	<i>31/185</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>31/00</i>	(2006.01)
<i>A23L</i>	<i>1/30</i>	(2006.01)	<i>A61P</i>	<i>3/00</i>	(2006.01)
<i>A61Q</i>	<i>19/00</i>	(2006.01)			

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011128335/04, 04.12.2009

(24) Effective date for property rights:
04.12.2009

Priority:

(30) Convention priority:
09.12.2008 ES P200803480

(43) Application published: 20.01.2013 Bull. № 2

(45) Date of publication: 20.10.2014 Bull. № 29

(85) Commencement of national phase: 11.07.2011

(86) PCT application:
ES 2009/070561 (04.12.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/066931 (17.06.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

EhSKRIBA RUIS Pablo Visente (ES),
BUSKETS KSAUBET Ksav'er (ES),
BARSELO KOBLIKhN Gvendolin (ES),
L'ADO KAN'EL'AS Viktorija (ES),
AL'VARES MARTINES Rafaehl' (ES),
TERES KhIMENES Sil'vija (ES),
LOPES Daniehl' (ES),
BARSELO EhSTAREL'AS Khuana (ES),
TEJLOR GRIN Khulian (ES),
AVILA MARTIN Kherardo (ES)

(73) Proprietor(s):

UNIVERSITAT DE LEZ IL' BALEAR (ES)

(54) ALPHA-DERIVATIVES OF CIS-MONOUNSATURATED FATTY ACIDS APPLICABLE AS THERAPEUTIC AGENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to new compounds of formula I: $\text{cis-COOR-XCH}-(\text{CH}_2)_a\text{-CH=CH}-(\text{CH}_2)_b\text{-CH}_3$, wherein (a) and (b) can take any value from 0 to 14, (X) is specified in: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ and CH₃COO, and (R) represents sodium (Na) applicable for preventing and/or treating obesity, hypertension and/or cancer. Also, the invention refers to using the compounds of

formula I for preparing a pharmaceutical and/or nutrient composition, to the pharmaceutical and/or nutrient composition based on the compounds of formula I, to a cosmetic, non-therapeutic method for improving skin manifestations and to a method for preventing and/or treating the diseases in humans and animals with using the compounds of formula I.

EFFECT: preparing the new compounds.

18 cl, 22 dwg, 5 tbl, 9 ex

(51) Int. Cl.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к фармацевтически приемлемым α -производным *цис*-мононенасыщенных жирных кислот Формулы I, их солям или производным (см. описание изобретения) для применения в качестве лекарственных средств, предпочтительно для профилактики и/или лечения заболеваний, этиология которых основана на изменениях (по любой причине) липидов клеточной мембраны, таких как, например, изменения в уровне, составе или структуре этих липидов. Оно также относится к их применению при патологиях, при которых регуляция липидного состава и структуры мембраны вызывает регрессирование патологического состояния. При этом в настоящем изобретении применение соединений Формулы I, где (X) замещен OH, NH₂ или CH₃ и (R) замещен H, для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения и для лечения рака легкого, мозга или простаты у людей не допускается.

Таким образом, настоящее изобретение в связи с его широким спектром применения может быть включено в основную область медицины и фармации.

СУЩЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Клеточные мембраны представляют собой структуры, которые определяют целостность клеток и содержащихся в них органелл. Большинство биологических процессов происходит в мембранах или вблизи от них, и составляющие их липиды выполняют не только структурную роль, но также регулируют активность важных процессов. Более того, регуляция липидного состава мембран также влияет на локализацию или функцию важных белков, вовлеченных в контроль клеточной физиологии, таких как белок-G и РКС (Escribá et al., 1995; 1997; Yang et al; 2005; Martinez et al., 2005). Эти и другие исследования демонстрируют значимость липидов в контроле важных клеточных функций. Действительно, многие заболевания человека, включая: рак, сердечно-сосудистые патологии, нейродегенеративные процессы, ожирение, метаболические нарушения, воспаление, инфекционные заболевания и аутоиммунные заболевания, связывали с изменениями в уровнях или в химическом составе липидов, находящихся в биологических мембранах. Дополнительные доказательства получены в результате благотворного воздействия терапии жирными кислотами, отличными от таковых по настоящему изобретению, которые регулируют состав и структуру мембранных липидов, где они используются для регрессирования таких заболеваний (Escribá, 2006).

Липиды, потребляемые при питании, регулируют липидный состав клеточных мембран (Alemany et al., 2007). Также различные физиологические или патологические ситуации могут изменить липиды, находящиеся в клеточных мембранах (Buda et al., 1994; Escribá, 2006). Изменения липидного состава мембран воздействуют на передачу сигналов в клетке, потенциально вызывая развитие заболевания или регрессирование заболевания (Escribá, 2006). Насыщенные жирные кислоты, потребляемые с пищей, оказывают некоторое негативное воздействие на состав и структуру мембраны, что может вызвать различные патологии, такие как рак, нарушения обмена веществ (диабет, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия и т.п.), ожирение, сердечные и сосудистые заболевания, воспаление, нейродегенеративные процессы и т.п. Эта теория также объясняет изменения, вызванные другими жирами, такими как денатурированное рапсовое масло, которое одновременно вызывает токсический синдром с разрушительными последствиями, приводя к стойкой нетрудоспособности и смерти во многих случаях. Напротив, липиды, оказывающие благоприятное воздействие на состояние здоровья, благотворны для всех клеток и, тем самым, могут воздействовать на многочисленные патологические процессы, что дает основание полагать, что жирные

кислоты по настоящему изобретению имеют широкий терапевтический спектр.

Кроме того, терапевтические воздействия, включающие регуляцию структуры и/или функции мембранных липидов, могут быть применены к патологиям, при которых у этих липидов не обнаруживают значительных изменений, но в результате воздействий на них (фармацевтическими или нутрицевтическими средствами) изменяется клеточная функция, приводя к регрессированию патологического процесса.

Различные исследования, выполненные в последние годы, указывают на то, что мембранные липиды играют гораздо более важную роль, нежели считалось до настоящего времени (Escribá et al., 2006). Пример этого значения продемонстрирован у рыб, живущих в реках, где варьирует температура, чьи липиды подвергаются значительным изменениям (в химическом составе мембран и в типах липидов), когда температура падает с 20°C (летом) до 4°C (зимой) (Buda et al. 1994). Подобные исследования демонстрируют, что изменения липидов мембран вызывают ряд координированных изменений клеточных функций для поддержания надлежащей клеточной физиологии. В случае рыб, живущих в воде с изменяющейся температурой, регуляция липидов мембран позволяет сохранять функции в самых различных типах клеток. Таким образом, можно говорить о том, что липиды мембран могут определять надлежащее или неэффективное функционирование разнообразных механизмов передачи клеточных сигналов.

При условии, что больной организм поражен болезнью, поскольку его клетки повреждены, изменения мембранных липидов могут обуславливать возникновение заболеваний. Аналогично, терапевтические, нутрицевтические или локальные/косметические воздействия, направленные на регуляцию уровней мембранных липидов, могут предотвращать или вызывать регресс (излечивать) патологических процессов.

Кроме того, многочисленные исследования указывают на то, что потребление насыщенных и *транс*-мононенасыщенных жиров имеет отношение к ухудшению здоровья. Сосудистые и другие заболевания и опухоли напрямую связывали с этими типами липидов (Stender and Dyerberg, 2004). Ухудшение состояния организма является проявлением возникновения этих и других типов заболевания. В этом смысле, потребление специфических типов липидов имеет четкое положительное или отрицательное воздействие. С одной стороны, как описано выше, насыщенные или *транс*-ненасыщенные жирные кислоты оказывают негативное воздействие на многие физиологические параметры, будучи вовлеченными в липидные изменения, которые приводят к возникновению многочисленных патологий (гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабету, метаболическому синдрому и т.п.), раку, сердечно-сосудистым патологиям, воспалению и т.п. Напротив, *цис*-мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты связывали с профилактикой этих заболеваний или реабилитацией после них. Все эти результаты однозначно указывают на то, что липидные изменения могут вызвать пагубные изменения клеточной физиологии и что регуляция состава и липидной структуры мембран может вызвать регресс этих негативных изменений путем координированной регуляции определенных клеточных функций.

Таким образом, изменения в составе и структуре мембран связывают с этиологией многих патологий, и в большинстве случаев проявление определенного заболевания происходит вследствие сочетания этих изменений с другими изменениями, влияющими на специфические белки, которые взаимодействуют с мембраной или входят в состав сигнальной последовательности других белков, с ними взаимодействующими. Таким образом, воздействия на структуру и функцию биологических мембран посредством

молекул, предусмотренных в настоящем изобретении, могут эффективно модифицировать определенные клеточные функции с конечным результатом в виде регрессирования специфических патологических процессов. Учитывая известную связь изменений, как структурных, так и функциональных, липидов, находящихся в клеточной мембране, с развитием различных заболеваний разных типов, но унитарно связанных этой этиологией, настоящее изобретение сфокусировано на фармацевтически приемлемых α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, их солях и производных, которые используются в лечении и/или профилактике этих заболеваний. Поражает то, что в настоящем изобретении показано, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть успешно применены для регуляции проведения клеточного сигнала, предотвращая появление важных заболеваний или обуславливая реабилитацию после них.

Патенты WO2005041691 и WO2003030891, в основном, относятся к профилактике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний (таких как гипертония) и ожирения и к лечению рака легкого, мозга или простаты посредством применения соединений формулы $\text{COOH-CHR-(CH}_2\text{)}_m\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$, в *цис*- или *транс*-конфигурациях, где группа R может быть замещена H, OH, NH_2 или CH_3 или другими группами с молекулярным весом менее 200 Да и где карбоксильная группа имеет атом водорода (H). Однако документы патентов WO2005041691 и WO2003030891 не имеют отношения к применению этих же соединений для профилактики рака и/или для профилактики и/или лечения кожных патологий, нейродегенеративных патологий, поражений нервных волокон, процессов воспаления, инфекционных патологий или метаболических патологий, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, диабет или метаболический синдром. Более того, в этих патентах ничего не говорится о применении соединений этой формулы, но где позиция R (X в настоящем изобретении) может быть замещена различными радикалами, такими как F, F_3C , HS или O-CH_3 , для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий. При этом эти патенты также не раскрывают применение соединений этой формулы, но где позиция R (X в настоящем изобретении) может быть замещена различными группами, такими как, например: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O-CH_3 , PO_4 $(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ или CH_3COO , и позиция H карбоксильной группы (R в настоящем изобретении) может быть замещена различными группами, такими как, например: натрий (Na), сложный метиловый эфир (OMe), сложный этиловый эфир (EE) или аммоний (NH_3), для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий. При этом эти патенты также не раскрывают применение соединений этой формулы, но где позиция R (X в настоящем изобретении) может быть замещена различными группами, такими как, например: PO_4 $(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ или CH_3COO , и позиция H карбоксильной группы (R в настоящем изобретении) остается H, для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий. Наконец, ни один из документов, обнаруженных в существующем уровне техники, не раскрывает применение соединений этой формулы, но где позиция R (X в настоящем изобретении) может быть замещена различными группами, такими как, например: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O-CH_3 , PO_4 $(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ или

CH₃COO, и позиция Н карбоксильной группы (R в настоящем изобретении) может быть замещена различными группами, такими как, например: Н, натрий (Na), сложный метиловый эфир (OMe), сложный этиловый эфир (EE) или аммоний (NH₃), в индукции нейрорегенерации, профилактике и/или лечении поражений нервных волокон и/или профилактике и/или лечении боли.

Таким образом, более высокая эффективность изомеров в *цис*-конфигурации продемонстрирована в настоящем изобретении, и были отобраны новые группы, приводящие к образованию соединений, которые были успешно применены для профилактики и/или лечения заболеваний, где общая этиология базируется на структурных и/или функциональных изменениях липидов, обнаруженных в клеточной мембране, таких как: рак, сосудистые патологии, кожные патологии, метаболические патологии, нейродегенеративные патологии, поражения нервных волокон, боль, процессы воспаления, ВИЧ и малярия. Кроме того, как упоминалось ранее, настоящее изобретение демонстрирует новые применения соединений, представленных в патентах WO2005041691 и WO2003030891, заключающиеся в: профилактике и лечении различных типов рака, кожных патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления, инфекционных патологий, поражений нервных волокон и боли. Также были открыты новые производные и комбинации молекул настоящего изобретения с другими активными ингредиентами и эксципиентами, в обоих случаях с более высокой фармацевтической эффективностью, для лечения некоторых патологий.

Ни один из документов, обнаруженных в существующем уровне техники, не раскрывает специфического применения α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот и их солей в комбинированных способах лечения с другими активными ингредиентами и эксципиентами для целей, заявленных в настоящем изобретении. Кроме того, особо важное значение выбранных соединений, обладающих структурными характеристиками, общими с α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (двойная связь в *цис*-положении и специфические замены на α -углеродном атоме и протона карбоксильной группы и фармацевтически приемлемых соответствующих структур), продемонстрировано в настоящем изобретении таким образом, что они могут быть эффективно применены в лечении заболеваний, где этиология связана со структурными и/или функциональными изменениями липидов мембран. Таким образом, в настоящем изобретении представлены сравнительные примеры, где продемонстрировано, что другие соединения, подобные таковым, используемым в настоящем изобретении, но без этих общих структурных характеристик, не являются столь эффективными, как α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот по изобретению.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Альфа-производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот для применения в качестве лекарственных средств. Настоящее изобретение относится к фармацевтически приемлемым соединениям Формулы I, их солям и производным, где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, для применения в качестве лекарственных средств.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к α -производным *цис*-мононенасыщенных жирных кислот и их солям или фармацевтически приемлемым формам для применения в качестве лекарственных средств предпочтительно в лечении и/или профилактике заболеваний,

объединенных по их этиологии, которая связана со структурными или функциональными изменениями липидов мембран. Применение соединений Формулы I, где (X) замещен OH, NH₂ или CH₃ и (R) замещен H, для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения и для лечения рака легких, мозга или простаты у людей, не допускается.

Заболевания или патологии, которые связаны их общей этиологией и подвержены профилактике или лечению посредством применения α-производных

цис-мононенасыщенных жирных кислот по изобретению, представляют собой, например:

- Рак (см. **Таблицу 2**): рак простаты, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, лейкемию, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак мозга, рак легкого.

- Сосудистые патологии: атеросклероз, кардиомиопатии, ангиогенез, гиперплазию сердца и гипертензия.

- Кожные патологии: целлюлит, витилиго и псориаз.

- Метаболические патологии: гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, диабет, метаболический синдром и ожирение.

- Нейродегенеративные патологии: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и склероз.

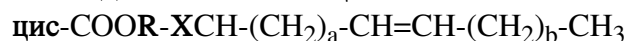
- Воспалительные процессы, приводящие к боли, сердечно-сосудистым заболеваниям, системным заболеваниям, старению, респираторным заболеваниям и ревматоидному артриту.

- Инфекционные патологии: СПИД и малярию.

- Поражения нервных волокон: патологии, связанные с нейрональным повреждением, патологическую произвольную моторную функцию с дисфункцией корково-спинномозгового пирамидного пути или без нее или экстрапирамидный двигательный паралич, спастичность в результате повреждения спинного мозга с компонентом центральной сенсibilизации или без него и т.п. Соединения по изобретению являются, таким образом, эффективными в индуцировании нейрорегенерации.

- Боль, вызванную повреждением центральной нервной системы: процессы, требующие обезболивания, невропатическую боль, изменения ноцицепции и т.п.

α-Производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, используемые в настоящем изобретении с этой целью (в дальнейшем в этом документе называемые жирными кислотами по изобретению), принадлежат к структурной группе 1, показанной в **Таблице 1**, и к соединениям **Таблицы 5** и описываются общей Формулой (I):



Формула I

где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X), соединенный с α-углеродным атомом, может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, оба (X) и (R) выбраны, например, из: спиртов, органических кислот, алкильных групп, аминогрупп, галогенов, алкилгалогенидов, алкилоксигрупп и меркаптогрупп.

В частном варианте осуществления изобретения радикал (X) может быть замещен группой, выбранной из: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ и CH₃COO.

В другом частном варианте осуществления изобретения радикал (R) может быть замещен: H, натрием (Na), сложным метиловым эфиром (OMe), сложным этиловым эфиром (EE), аммонием (NH₃) и любым другим радикалом, который образует соль или фармацевтически приемлемую форму соединений Формулы I.

Для эффективного функционирования этой структуры необходимы двойная связь (=) в *цис*-конфигурации и перечисленные выше замены у α -углеродного атома.

Исследования, проведенные с применением этих молекул, аналогичных тем, что описываются Формулой I, но не имеющих замен у α -углеродного атома (X представляет собой атом водорода), имеющих *транс*-двойную связь или не имеющих двойной связи (насыщенные жирные кислоты), демонстрировали более низкую профилактическую или лечебную активность относительно той, что была выявлена у жирных кислот по изобретению.

Были исследованы различные соли молекул по изобретению (Таблица 5). Их эффективность в некоторых случаях значительно лучше таковой свободных жирных кислот. Этот эффект может быть обусловлен улучшением абсорбции соединений или их распределения. Таким образом, в настоящем изобретении было показано, что замена водорода карбоксильной группы (R) приводит к образованию определенных солей или производных, которые демонстрируют фармакологически лучшую активность, нежели сами по себе свободные жирные кислоты. Например, натриевая соль, в которой R замещен Na, вызывает более значительные уменьшения объема опухолей, нежели форма, в которой R замещен H, поэтому натриевой соли будет отдано предпочтение при приготовлении фармацевтической или нутрицевтической композиции для профилактики или лечения рака.

Определенные периферические сигнальные белки, вовлеченные в передачу сигнала к внутренней части клеток, могут быть заякорены в участках с рыхлой укладкой поверхности (Фигура 1). Жирные кислоты, которые являются ненасыщенными в *цис*-конфигурации и с заменами у α -углеродного атома, отличными от замен H, располагаются в мембране (либо в их свободной форме, либо образуя часть структур большего размера, таких как фосфолипиды), обуславливая неоднородность при укладке полярных головок фосфолипидов, выявляемых на поверхности клеточного барьера, где могут связываться белок-G, РКС и белки Ras-типа. Напротив, насыщенные или *транс*-мононенасыщенные жирные кислоты предотвращают связывание этих белков с мембранами, препятствуя проведению клеточного сигнала. Это не означает, что насыщенные жирные кислоты должны быть исключены из рациона питания, но означает то, что уровни потребления этих липидов, присутствующих в стандартных рационах питания в странах со средним или высоким уровнем развития, выше тех, что требуются клеткам для правильного выполнения ими функций. Действительно, различные липидные микродомены (например, «липидные плоты»), которые образуются в мембранах, представляют собой пространственно-временные платформы, где белки, имеющие сродство к этим доменам (основано на белково-липидных взаимодействиях), могут скапливаться и могут эффективно взаимодействовать, создавая возможность для проведения клеточных сигналов. Любое изменение в плотности или структуре этих доменов имеет такие последствия для проведения клеточных сигналов, что фармацевтические и нутрицевтические воздействия, приводящие к регуляции мембранных липидов, могут быть более или менее эффективными, нежели те, что воздействуют на белки или нуклеиновые кислоты напрямую.

Широкий спектр терапевтического применения, обеспечиваемого жирными кислотами по изобретению, продемонстрирован различными явлениями. Прежде всего потребление липидов с отрицательными воздействиями (насыщенные и *транс*-мононенасыщенные жиры) или положительными воздействиями (*цис*-мононенасыщенные жиры) оказывает аналогичное влияние на все клетки организма таким образом, что их воздействия, как отрицательное, так и положительное, проявляются во многих направлениях: индукция

или подавление ожирения, гипертензии, рака и т.п. Когда потребляется определенный тип липида, он распределяется по всему организму и вызывает регуляцию разновидностей липидов в клеточных мембранах всех органов. Изменения уровней липидов как следствие специфических физиологических или патологических процессов

5 (таких как адаптация пойкилотермных рыб к холодной воде) воздействуют практически на все клетки организма (Buda et al., 1994). Наконец, жирные кислоты могут храниться или распадаться с образованием энергии. Действительно, эти молекулы являются исключительным клеточным топливом, поскольку прямое применение немодифицированных жирных кислот оказывает умеренное влияние на здоровье.

10 Однако блокирование их распада путем внесения модификаций у α -углеродного атома позволяет этим молекулам существовать в течение долгого времени как в цитоплазме, так и в мембране, тем самым обеспечивая их терапевтическое действие. В этом смысле было показано, что уровни α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот в плазме крови поддерживаются на высоких уровнях через один час после введения (50-

15 60% от исходных уровней), в то время как природные жирные кислоты практически не выявлялись после этого периода времени (уровни составляли 2-4%). Следовательно, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, используемые в настоящем изобретении, вызывают широкий диапазон положительных эффектов без наблюдаемых побочных эффектов. Для демонстрации того, что именно жирные кислоты, которые

20 являются ненасыщенными в *цис*-конформации и с заменой у α -углеродного атома на атом, отличный от Н, и что никакие другие подобные структуры не обладают терапевтическими свойствами на разных уровнях, различные типы жирных кислот (см. Таблицу 1), принадлежащие различным структурным группам (1-4), были исследованы в настоящем изобретении: α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот

25 (жирные кислоты по изобретению) (1), жирные кислоты с двойной связью в *цис*-конфигурации, но без модификаций у α -углеродного атома, отличных от Н (2), жирные кислоты с α -углеродным атомом, замещенным радикалами, отличными от Н, но без двойной связи в *цис*-конфигурации (3), жирные кислоты без двойной связи в *цис*-конфигурации и без замен у α -углеродного атома, отличных от Н (4).

30 Механизм действия этих молекул (основанный на регуляции состава и структуры биологических мембран) отличается от такового большинства лекарственных препаратов, используемых для лечения патологий человека (основанного на взаимодействии с белками, в большинстве случаев, или нуклеиновыми кислотами). Следовательно, они могут быть применены в комбинированной терапии, в которой

35 одно из соединений по настоящему изобретению используется в дополнение, по меньшей мере, к другой молекуле (активному ингредиенту и/или эксципиенту), и комбинированная терапия может быть намного более эффективной, чем монотерапия лишь с одним из соединений. В настоящем изобретении показано, например, что ОНОД,

40 комбинированный с любым из исследуемых противоопухолевых лекарственных препаратов (темозоломидом, эрлотинибом, гемцитабином, цисплатином), имеет более высокий терапевтический эффект, нежели таковой любого из соединений, примененного в отдельности.

Широкий спектр терапевтического применения, обеспечиваемый жирными кислотами по изобретению, позволил прийти к общему предположению о том, что липиды с

45 *цис*-мононенасыщенной структурой придают специфические структурные свойства, способствующие надлежащей активности процессов, осуществляемых в мембранах и самими мембранами. Другими словами, жирные кислоты по изобретению могут быть эффективно применены для профилактики и/или лечения любого заболевания, где

этиология связана либо с изменениями уровней, химического состава, структуры, либо с любым другим типом изменений липидов биологических мембран, либо с измененной регуляцией проведения клеточного сигнала как результат этих изменений липидов, находящихся в биологических мембранах.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединению Формулы I: фармацевтически приемлемое $\text{цис-COOR-XCH}-(\text{CH}_2)_a\text{-CH=CH}-(\text{CH}_2)_b\text{-CH}_3$, его соли и его производные, где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, оба (X) и (R) выбраны из: спиртов, органических кислот, алкильных групп, аминогрупп, галогенов, алкилгалогенидов, алкилоксигрупп и меркаптогрупп, для применения отдельно или в комбинации с другими соединениями в качестве лекарственных препаратов у людей и животных; исключая соединения Формулы I, где (R) представляет собой H, и (X) замещен OH, NH_2 или CH_3 , для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения и для лечения рака легкого, мозга и простаты.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения (X) замещен группой, выбранной из: OH, NH_2 и CH_3 , и (R) замещен H в Формуле I, что приводит к образованию соединений для применения для профилактики рака и/или для профилактики и/или лечения кожных патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления, инфекционных патологий или метаболических патологий, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, диабет или метаболический синдром.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения (X) замещен группой, выбранной из: F, F_3C , HS и O- CH_3 , и (R) замещен H в Формуле I, что приводит к образованию соединений для применения для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения (X) замещен группой, выбранной из: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O- CH_3 , $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ или CH_3COO , и (R) может быть замещен натрием (Na), сложным метиловым эфиром (OMe), сложным этиловым эфиром (EE) или аммонием (NH_3) в Формуле I, что приводит к образованию соединений для применения для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения (X) замещен группой, выбранной из: $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ и CH_3COO , и (R) замещен H в Формуле I, что приводит к образованию соединений для применения для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления и инфекционных патологий.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения (X) замещен группой, выбранной из: OH, NH_2 , CH_3 , F, F_3C , HS, O- CH_3 , $\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ и CH_3COO , и (R) замещен группой, выбранной из: H, натрия (Na), сложного метилового эфира (OMe), сложного этилового эфира (EE) или аммония (NH_3) в Формуле I для применения в индукции нейрорегенерации, профилактике и/или лечении поражений нервных волокон и/или профилактике и/или лечении боли.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения соединения

Формулы I представляют собой: OHND, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHDE, Na-OHOD, OMe-OHOD, EE-OHOD, NH₃-OHOD, ACOD, Na-ACOD, OMe-ACOD, EE-ACOD, Na-MOOD, OMe-MOOD, EE-MOOD, DEPOD, Na-DEPOD, OMe-DEPOD и EE-DEPOD.

Как описано ранее, соединения могут быть применены в комбинации с другими активными ингредиентами или эксципиентами с образованием фармацевтических и/или нутрицевтических композиций, пригодных для профилактики и/или лечения рака, сосудистых патологий, кожных патологий, метаболических патологий, нейродегенеративных патологий, процессов воспаления или инфекционных патологий и/или для индукции нейрорегенерации, профилактики и/или лечения поражений нервных волокон и/или профилактики и/или лечения боли.

Таким образом, жирные кислоты по изобретению могут быть применены отдельно или быть в составе фармацевтических или нутрицевтических композиций, где они объединены с эксципиентами, такими как, например: связующие вещества, наполнители, разрыхлители, скользящие вещества, покрытия, подсластители, ароматизаторы, красящие вещества, носители и т.п., и комбинации вышеперечисленного. Также жирные кислоты по изобретению могут составлять часть фармацевтических или нутрицевтических композиций в комбинации с другими активными ингредиентами. Применительно к целям настоящего изобретения термин "нутрицевтический" определен как соединение, которое принимается внутрь периодически во время питания или в качестве кормовой добавки и которое служит для профилактики или регрессирования заболеваний, в данном случае заболеваний, где этиология связана с изменениями липидов клеточной мембраны.

Применение жирных кислот по изобретению может быть выполнено любым способом, таким как, например, энтеральный (через пищеварительный тракт), пероральный (пилюли, капсулы, порошки, эмульсии, таблетки или сиропы), ректальный (суппозитории или клизмы), местный (кремы или пластыри), ингаляционный способ, парентеральная инъекция, внутривенная инъекция, внутримышечная инъекция или подкожная инъекция, в форме, указанной выше, или в любой фармацевтически приемлемой форме, такой как, например: метилы, этилы, фосфаты, другие радикалы сложноэфирного типа, простые эфиры, алкилы и т.п.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической и/или нутрицевтической композиции, которая включает соединение Формулы I, где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, и, по меньшей мере, одно дополнительное соединение с терапевтической или эксципиентной активностью.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения этот эксципиент, составляющий смесь в комбинации с другими соединениями по изобретению, представляет собой альбумин, например: овальбумин, лактальбумин, природный или рекомбинантный альбумин человеческого, бычьего, мышинового или кроличьего происхождения, более предпочтительно человеческий сывороточный альбумин или бычий сывороточный альбумин. Таким образом, композиция, включающая жирную кислоту по изобретению и альбумин, эффективна для профилактики и лечения показаний, перечисленных выше, предпочтительно для индукции нейрорегенерации, профилактики и/или лечения поражений нервных волокон и/или профилактики и/или лечения боли. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция включает OHOD

или любое его производное, такое как, например, Na-OHOD, и альбумин.

Композиция, включающая жирную кислоту по изобретению и другой активный ингредиент, эффективна для профилактики и лечения показаний, перечисленных выше, предпочтительно для профилактики и/или лечения рака, когда активный ингредиент представляет собой противораковое соединение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция включает OHOD и/или Na-OHOD и противораковое соединение, выбранное, например, из: темозоломида, эрлотиниба, гемцитабина и цисплатина.

Другой аспект настоящего изобретения относится к косметическому, не терапевтическому, способу для улучшения кожных проявлений, включающему нанесение на кожу эффективного количества, по меньшей мере, одного фармацевтически или косметически приемлемого соединения Формулы I и/или его солей или производных, где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, выбранных из: спиртов, органических кислот, алкильных групп, аминок групп, галогенов, алкилгалогенидов, алкилоксигрупп и меркаптогрупп.

Наконец, настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или терапевтическому лечению заболеваний у людей и животных, где общая этиология связана со структурными и/или функциональными изменениями липидов клеточной мембраны, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного фармацевтически приемлемого соединения Формулы I отдельно или в комбинации с другими соединениями, его солей или производных, где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 4 до 200 Да, и (R) может быть замещен любым атомом или группой атомов с атомным/молекулярным весом от 1 до 200 Да, оба (X) и (R) выбраны из: спиртов, органических кислот, алкильных групп, аминок групп, галогенов, алкилгалогенидов, алкилоксигрупп и меркаптогрупп, исключая введение соединений Формулы I, где (R) представляет собой H, и (X) замещен OH, NH₂ или CH₃, для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения и для лечения рака легких, мозга или простаты.

Применительно к целям настоящего изобретения под термином «терапевтически эффективное количество» понимают количество, которое приводит к регрессу заболевания или предотвращает его без проявления отрицательных побочных эффектов, или, в случае когда вызваны такие эффекты, они приемлемы в соответствии с критериями фармацевтических регуляторных органов (в основном, где польза выше причиненного вреда; например, эпизоды тошноты, приемлемые у пациентов, больных раком с неблагоприятным прогнозом).

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Связывание белков проведения клеточного сигнала с клеточными мембранами. Периферические белки проведения сигнала (A, B и C) связываются с мембранами через один или несколько механизмов, таких как специфическое взаимодействие с мембранными липидами, электростатические взаимодействия и/или вставка гидрофобных участков в области с высокой предрасположенностью к образованию неламеллярных структур, опосредованному *цис*-мононенасыщенными липидами. Таким образом, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут регулировать взаимодействие определенной мембраны и белков проведения клеточного сигнала.

Фигура 2. Профилактическое действие различных жирных кислот против развития опухоли. По горизонтали отложен тип жирной кислоты, применяемой для профилактики развития рака, и по вертикали отложен объем опухоли. Животные получали лечение до инъекции опухолевых клеток, и впоследствии лечение поддерживалось. Животных контрольной группы не подвергали лечению, и объем их опухолей был принят за исходное значение (100%). Жирные кислоты по изобретению (ОННД, ОНОД, МОД, АОД, ФОД, ТФМОД, МООД, ШНОД, МОД11, ОНОД11, ОННН и ОНННН) оказывали статистически более значимый эффект ($p < 0,05$ во всех случаях) нежели *цис*-мононенасыщенные жирные кислоты без модификаций по α -положению (НН, ННН, ННОД, ОНОД), нежели насыщенные жирные кислоты той же самой длины (НН, ОН, ННОД) и α -производные жирных кислот, которые не были *цис*-мононенасыщенными (ОННН, тОННОД) (см. Таблицу 1).

Фигура 3.

А. Раковые клетки (А549) были обработаны различными концентрациями ОНОД и МОД11, чтобы определить, зависит ли эффект от концентрации. По горизонтали отложена мкМ концентрация используемых жирных кислот, и по вертикали отложена жизнеспособность необработанных клеток А549 (% от контроля). Эти клетки были обработаны различными концентрациями (0-400 мкМ) ОНОД и МОД11, и число клеток было определено проточной цитометрией. Оба соединения снижали рост опухолевых клеток, демонстрируя значения IC_{50} (концентрация, уменьшающая число жизнеспособных клеток до 50%) в диапазоне от 50 до 100 мкМ после 48 часов инкубации. Дозы в диапазоне от 200 до 400 мкМ приводили к полному уничтожению опухолевых клеток во всех случаях.

В. Раковые клетки (А549) были обработаны соединениями, указанными на горизонтальной оси, в течение 48 часов при 150 мкМ. Затем клетки были посчитаны, и их число и процент от необработанных клеток (контроля) были отложены по вертикали. В этих культурах инкубация 150 мкМ жирными кислотами по изобретению вызывала ингибирование роста опухолевых клеток ($p < 0,05$ во всех случаях), указывая на то, что они представляют собой эффективные молекулы для лечения рака.

Фигура 4. Раковые клетки (А549) были инкубированы в отсутствие (слева) и в присутствии (справа) ОНОД (100 мкМ, 48 ч). Затем они были фиксированы, инкубированы в присутствии антител к кадгерину и визуализированы конфокальной микроскопией. Обработка 50 мкМ ОНОД (48 ч) вызывала увеличение уровней этого белка на $73,6 \pm 5,4\%$. При обработке жирными кислотами по изобретению наблюдали значительное увеличение уровней кадгерина.

Фигура 5. Инвазивная способность раковых клеток легкого (А549) в культуре в отсутствие (контроль, С) или в присутствии ОНОД (2-гидрокси-9-*цис*-октадеценная кислота) в концентрации 50 мкМ (М50) и 100 мкМ (М100) и в разное время. Раковые клетки легкого, культивируемые в присутствии ОНОД, обладали меньшей инвазивной способностью относительно той, что была выявлена у необработанных клеток (С) ($p < 0,05$). Эти результаты указывают на то, что жирные кислоты по изобретению могут быть применены для профилактики или лечения развития опухолевых метастазов.

На представленной справа фигуре этих результатов показано число инвазивных клеток по вертикали и время в часах по горизонтали.

Фигура 6. Воздействие различных солей ОНОД на рак легкого человека на животной модели рака.

А. Объем опухолей в бестимусных мышках, зараженных раковыми клетками мозга человека SF767 (выражен в виде процента относительно контроля), получающих

различное лечение. Животные, получавшие наполнитель (воду: Контроль), 600 мг/кг ОНOD в форме свободной жирной кислоты (ОНOD), 600 мг/кг натриевой соли ОНOD (Na-ОНOD) или 600 мг/кг аммониевой соли ОНOD (NH₃ОНOD) ежедневно в течение 50 дней. Все виды лечения вызывали статистически значимые уменьшения размера опухолей у леченных животных (*** $p < 0,001$), и лечение Na-ОНOD было значительно более эффективным, нежели лечение свободной жирной кислотой ОНOD (# $p < 0,05$).

В. Действие различных доз натриевой соли ОНOD (Na-ОНOD) на объемы опухолей продемонстрировано у мышей, зараженных клетками SF767 и леченных наполнителем (контроль, 0 мг/кг), 100 мг/кг (100), 200 мг/кг (200), 400 мг/кг (400) и 600 мг/кг (600) в течение 50 дней. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Фигура 7. Действие натриевой соли ОНOD (Na-ОНOD) на различные типы опухолей человека на животных моделях.

А. Действие Na-ОНOD (600 мг/кг ежедневно в течение 50 дней) на объем опухолей у лишенных иммунной системы мышей («голых») и у лишенных иммунной системы мышей, зараженных клетками лейкемии человека (клетками Jurkat).

В. Действие Na-ОНOD (600 мг/кг ежедневно в течение 50 дней) на объем опухолей у бестимусных мышей, инокулированных клетками рака простаты человека (клетками PC3).

С. Действие Na-ОНOD (600 мг/кг ежедневно в течение 50 дней) на объем опухолей у бестимусных мышей, инокулированных клетками рака молочной железы человека (клетками MDA-MB-231).

Д. То же самое с клетками рака толстой кишки человека (клетки HT29). Все лечебные мероприятия продолжались в течение 50 дней, и контрольные животные были лечены наполнителем (водой). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Эта фигура демонстрирует, что форма Na-ОНOD (натриевая соль ОНOD) проявляет более высокую эффективность, нежели соответствующая свободная жирная кислота в лечении различных типов рака человека, ксенотрансплантированных в лишенных иммунной системы мышей: лейкемии, рака простаты, рака молочной железы и рака толстой кишки.

Фигура 8. Действие Na-ОНOD (натриевой соли ОНOD) и комбинаций с различными лекарственными препаратами: темозоломидом (TMZ), эрлотинибом, гемцитабином и цисплатином (cis-Pt) на различные типы рака человека на моделях.

А. Действие терапии наполнителем (Контроль), темозоломидом (TMZ, 80 мг/кг), Na-ОНOD (ОНOD, 600 мг/кг) и TMZ плюс Na-ОНOD (одновременно в тех же самых дозах) в течение 60 дней на лишенных иммунной системы мышей, зараженных раком мозга человека (SF767).

В. То же самое с Na-ОНOD (ОНOD, 600 мг/кг), эрлотинибом (Erlotinib, 40 мг/кг), цисплатином (cis-Pt, 100 мг/кг), плюс эрлотиниб (ОНО Er) или Na-ОНOD плюс цисплатин (ОНО Pt) на бестимусных мышцах, зараженных клетками рака легкого человека (A549).

С. То же самое с Na-ОНOD (ОНOD, 600 мг/кг), гемцитабином (Gemcitab, 40 мг/кг) или Na-ОНOD плюс гемцитабин (ОНО Gem), используя те же самые дозы на бестимусных мышцах, зараженных клетками рака поджелудочной железы человека (BXPC3).

Было показано, что комбинирование Na-ОНOD с любым из этих лекарственных препаратов приводит к заметному уменьшению объема опухолей и значительно меньшему размеру опухолей, чем после воздействия либо Na-ОНOD в отдельности, либо любого из указанного выше противоопухолевого лекарственного препарата, применяемого в отдельности. Более того, оставшиеся опухоли, обнаруживаемые у большинства животных, леченных Na-ОНOD, и практически у всех, леченных двумя

молекулами одновременно, состояли из мертвых клеток без способности к регенерации опухоли. Таким образом, можно считать, что эти комбинированные лекарственные воздействия были эффективными в лечении опухолей человека, имплантированных в животных.

- 5 **Фигура 9.** Действие различных молекул на пролиферацию клеток аорты A10 после инкубации в течение 48 часов в концентрации 200 мкМ. По горизонтали представлены используемые жирные кислоты, и по вертикали отложено число клеток (% от контроля). Все клетки росли в идентичных условиях температуры, pH и культуральной среды за исключением одного из матрасов, откуда была удалена сыворотка (без сыворотки).
- 10 Жирные кислоты по изобретению вызывали остановку клеточной пролиферации подобно той, что была обусловлена удалением эмбриональной бычьей сыворотки (которая содержит множество клеточных ростовых факторов), в концентрации 200 мкМ ($p < 0,05$ во всех случаях). Эти результаты указывают на то, что эти молекулы останавливают пролиферацию клеток сердечно-сосудистой системы, не оказывая
- 15 токсического эффекта (число клеток то же самое или выше в сравнении с образцом без сыворотки).

- Фигура 10.** Действие различных жирных кислот для профилактики и лечения развития гипертензии у крыс SHR. По горизонтали представлены используемые жирные кислоты и по вертикали отложено артериальное давление (Hg). У животных, леченных жирными
- 20 кислотами по изобретению, не наблюдали развития гипертензии ($p < 0,05$ во всех случаях), в то время как у нелеченных животных или у животных, леченных жирными кислотами, не обладающими структурой, показанной в Формуле I, развивалась гипертензия.

- Фигура 11.** Действие OHOD на сократительный ответ, индуцированный норадреналином (NA), в аортах крыс SHR. По горизонтали отложен логарифм NA, и
- 25 по вертикали отложена концентрация (г). Аорты были обработаны OHOD (закрашенные кружки) или наполнителем (пустые кружки) в течение 60 минут в инкубаторе органов при 37°C в среде Рингера с кислородом. На фигуре показано, что сократительный ответ, индуцированный норадреналином (NA), был намного выше в аортах крыс, предварительно обработанных этой жирной кислотой ($p < 0,05$). Этот результат отчетливо
- 30 указывает на то, что пластичность сосудистой ткани значительно повышается ($p < 0,05$) в присутствии жирных кислот по изобретению.

- Фигура 12.** Действие жирных кислот по изобретению (нанесены на горизонтальную ось) на синтез меланина в мышинных меланоцитах (клетках B16, более светлые столбцы слева) и на пролиферацию адипоцитов (клеток 3T3-L1, более темные столбцы справа).
- 35 Результаты представлены в виде усредненного значения по трем независимым экспериментам. В этом смысле концентрации 100 мкМ этих соединений в течение 48 часов вызывали снижение содержания меланина в клетках B16 ($p < 0,05$ во всех случаях). Также молекулы, которые имеют структуру Формулы I, ингибировали рост клеток 3T3-L1 (жировых клеток или адипоцитов, $p < 0,05$ во всех случаях), в то время как
- 40 молекулы, не обладающие структурой Формулы I, не оказывали значимых воздействий на пролиферацию адипоцитов.

- Фигура 13.** Четыре столбца, слева направо соответственно, отражают действие терапии наполнителем (контроль, первый столбец), OHOD при 200 мг/кг (второй столбец), OHOD при 400 мг/кг (третий столбец) и OHOD при 600 мг/кг (четвертый
- 45 столбец) на уровни холестерина (группа из четырех столбцов слева), триглицеридов (группа из четырех столбцов посередине) и глюкозы (группа из четырех столбцов справа). Терапию проводили пероральным способом во всех случаях и поддерживали в течение 30 дней. Указанные значения представлены в виде усредненных величин,

полученных на 6 животных в каждой группе. Было обнаружено, что терапия ОНОД вызвала значимое снижение уровней холестерина, триглицеридов и глюкозы ($p < 0,05$ во всех случаях).

Фигура 14. Действие терапии наполнителем (контроль) или жирными кислотами по изобретению (600 мг/кг) на уровни холестерина, триглицеридов и глюкозы. Указанные значения представлены в виде усредненных величин, полученных на 6 животных. Каждая группа из трех столбцов представляет терапевтическое воздействие различной жирной кислотой, где левый столбец соответствует холестерину, средний столбец - триглицеридам и правый столбец - глюкозе. Было обнаружено, что жирные кислоты со структурой Формулы I вызывают значимое снижение по трем параметрам ($p < 0,05$), в то время как аналогичные молекулы, не обладающие структурой Формулы I, не оказывали эффективного действия в лечении метаболических патологий, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, диабет и метаболический синдром.

Фигура 15. Когнитивный индекс у мышей с болезнью Альцгеймера. Для этого исследования были применены мыши в возрасте шести месяцев, имеющих ряд мутаций, идентичных таковым, вызывающим болезнь Альцгеймера у людей, у которых проявлялись неврологические и когнитивные симптомы этого заболевания (Jackson Laboratories-Charles River). Столбцы соответствуют значениям когнитивного индекса, вычисленным как среднее значение результатов, полученных в тесте с применением радиальных рукавов лабиринта Миллера. В тесте Миллера было измерено время обнаружения платформы до обучения, деленное на время обнаружения платформы после обучения и выражено через 100%. В этом тесте время, затраченное животными, леченными наполнителем (водой, контроль), было принято за 100%. Более высокие значения этого параметра соответствуют меньшему времени обнаружения платформы после обучения, что обусловлено улучшением памяти у животных. В радиальных рукавах лабиринта было получено среднее число попыток до момента обнаружения платформы в лабиринте со стимулом (едой) до обучения, деленное на число попыток после обучения. Этот усредненный коэффициент у контрольных животных был принят за 100%, и увеличение этого параметра происходит вследствие меньшего числа попыток в зависимости от способности памяти животного. Используемые жирные кислоты показаны на горизонтальной оси. Каждая группа животных ($n=8$) была лечена наполнителем (контроль) или жирными кислотами по изобретению (100 мг/кг). После исследования было обнаружено, что жирные кислоты по изобретению были высокоэффективными в профилактике развития нейродегенеративного процесса (болезни Альцгеймера), основываясь на улучшении когнитивных параметров ($p < 0,05$ во всех случаях).

Фигура 16.

А. Изменение восстановления двигательной активности с 4 по 28 день после поражения нервного волокна (ось X) как функция произвольного движения на вращающемся барабане (ось Y) после поражения нервного волокна вследствие травмы (Cont), выраженное в виде процента времени, проведенного на установке, при сравнении с контролем каждой группы, полученным до травмы (100%). Представлены результаты для групп, леченных исключительно 10 мкл солевого раствора (Sal), альбумин-олеиновой кислотой (4 mM Alb-OA), альбумин-ОНОД (4 mM Alb-2ОНОД).

В. Клетки глиомы человека (U118) являются астроцитами центральной нервной системы (CMS), утратившими дифференцировку (Контроль). В присутствии Na-ОНОД (200 мкМ) клетки глиомы дифференцируются и развиваются в направлении глиального фенотипа, выпуская отростки, типичные для астроцитов. Эта дифференцирующая

активность может быть вовлечена в нейрорегенеративный процесс, необходимый для восстановления двигательной активности. Эти результаты демонстрируют, что OHOD и производные (например, Na-OHOD) эффективны в нейрорегенеративной терапии, необходимой для лечения поражений нервных волокон.

5 **Фигура 17.** Действие 10 мкл натриевого солевого раствора, альбумин-олеиновой кислоты (Alb-OA-4мМ) и альбумин-2-гидрокси-олеиновой кислоты (Alb-2OHOA-4мМ) на временную суммацию подошвенного рефлекса передней большеберцовой мышцы (ТА), имеющегося ниже ушиба среднего уровня Т8, выраженное в виде процента от исходного ответа. Ось Х фигуры представляет число стимулов, и ось Y представляет
10 увеличение интеграла рефлекса передней большеберцовой мышцы (в виде % от исходного ответа).

Крысы, леченные альбумином-OHOD (4 мМ, 10 мкл интратекальным способом введения), демонстрировали большее ингибирование временной суммации подошвенного сгибательного рефлекса передней большеберцовой мышцы спустя 28 дней после
15 поражения нервного волокна при сравнении с крысами, лечеными солевым раствором или альбумин-олеиновой кислотой. Эти результаты предполагают, что комплексы альбумин-OHOD высокоэффективны в терапевтическом лечении острой и хронической боли.

Фигура 18. Уровни интерлейкина 6, IL-6, (столбец слева) и транскрипционного фактора
20 TNF- α (столбец справа) в моноцитах человека в отсутствие (контроль) или при наличии провоспалительной обработки бактериальным липополисахаридом (LPS). Клетки, обработанные LPS, культивировали в отсутствие (контроль+LPS) или в присутствии различных жирных кислот, представленных на горизонтальной оси. В модели
клеточного воспаления (моноциты U937 в культуре, стимулированной бактериальным
25 липополисахаридом, LPS) жирные кислоты по изобретению (250 мкМ, 72 ч) значительно ингибировали экспрессию важнейших провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- α , $p < 0,05$).

Фигура 19.

А. Действие различных жирных кислот по ингибированию активности
30 циклооксигеназ-1 (COX-1) (Система скрининга ингибиторов COX-1, Cayman). По горизонтали представлен тип используемой жирной кислоты, и по вертикали отложена активность COX-1 (% от контроля). Клеточные культуры (дифференцированные моноциты U937) были обработаны жирными кислотами по изобретению (250 мкМ, 6 часов). По вертикали отложена активность COX-1 после лечения. Было обнаружено,
35 что жирные кислоты по изобретению (OHND, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHDE и OHDE) имеют более значимый эффект ($p < 0,05$ во всех случаях), нежели *цис*-мононенасыщенные жирные кислоты без модификации по α -положению (EE, DE, HOD, ODO), нежели насыщенные жирные кислоты той же самой
40 *цис*-мононенасыщенными (OHS, tOHOD).

В. Действие различных жирных кислот по ингибированию (концентрации белка) циклооксигеназы-2 (иммуноблот COX-2). По горизонтали представлен тип примененных жирных кислот, и по вертикали отложена клеточная концентрация COX-2 (% от
45 контроля). Клеточные культуры (дифференцированные моноциты U937) были обработаны жирными кислотами по изобретению (250 мкМ, 6 часов). Было обнаружено, что жирные кислоты по изобретению (OHND, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHDE и OHDE) имеют более значимый эффект ($p < 0,05$ во всех случаях), нежели *цис*-мононенасыщенные жирные кислоты без модификации по α -

положению (EE, DE, HOD, ODO), нежели насыщенные жирные кислоты той же самой длины (HD, OD, EO) и α -производные жирных кислот, которые не являлись *цис*-мононенасыщенными (OHS, tOHOD).

5 **Фигура 20.** Температура перехода ламеллярная-гексагональная фаза в модельных мембранах из диэлаидоил-фосфатидилэтаноламина (DEPE), измеренная дифференциальной сканирующей калориметрией. Используемые жирные кислоты представлены по горизонтали, и по вертикали отложена температура. Чем выше изменение температуры перехода, тем выше способность регулировать структуру мембраны, такой как та, что окружает клетки человека или вируса СПИДа. Жирные
10 кислоты по изобретению (соотношение жирная кислота:DEPE 1:20, моль:моль) вызывали значимое снижение ($p < 0,05$ во всех случаях) температуры перехода ламеллярная-гексагональная фаза.

Фигура 21.

15 **А.** Пример, представляющий воздействие жирных кислот по изобретению на «мембранный плот». Модельные мембраны из сфингомиелина/фосфатидилхолина/холестерина (модель мембранного плота) в отсутствие (слева) и в присутствии (справа) ОНОД. Наличие этой жирной кислоты вызывало уменьшение поверхности, занятой мембранными плотами и их средний размер.

20 **В.** Фигура демонстрирует количественное определение действия различных жирных кислот на общую площадь поверхности мембранных плотов (или упорядоченных ламеллярных участков мембраны, Lo, колонка слева) при сравнении с участками Ld (разупорядоченные ламеллярные участки мембраны; значение 100% относилось к контрольным мембранам) и на средний размер (средний диаметр) мембранных плотов (колонка справа) в мембранах из сфингомиелина/фосфатидилхолина/холестерина.
25 Жирные кислоты по изобретению регулируют структуру «липидных плотов», препятствуя вирусно-клеточному взаимодействию, необходимому, чтобы вызвать и размножить вирусную инфекцию.

30 **Фигура 22.** Уровни DHFR (дигидрофолатредуктазы) в клетках A549 после обработки различными жирными кислотами (горизонтальная ось) в концентрации 100 мкМ в течение 48 часов. Жирные кислоты по изобретению вызывали весьма заметное снижение уровня этого фермента, то есть они обладали выраженной активностью в профилактике и/или лечении малярии и других инфекционных процессов.

35

40

45

Таблица 1

Жирная кислота	Серия	Аббревиатура	Структурная группа	(a), (b)	(X)
α-гидрокси-цис-Δ9-гексадеценовая	16:1	OHHD	1	4, 7	OH
α-гидрокси-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	OHOD	1	6, 7	OH
α-метил-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	MOD	1	6, 7	CH ₃
α-амино-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	AOD	1	6, 7	NH ₂
α-фтор-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	FOD	1	6, 7	F
α-трифторметил-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	TFMOD	1	6, 7	F ₃ C
α-метокси-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	MOOD	1	6, 7	O-CH ₃
α-меркапто-цис-Δ9-октадеценовая	18:1	SHOD	1	6, 7	HS
α-метил-цис-Δ11-октадеценовая	18:1	MOD11	1	4, 9	CH ₃
α-гидрокси-цис-Δ11-октадеценовая	18:1	OHOD11	1	4, 9	OH
α-гидрокси-цис-Δ11-эйкозеновая	20:1	OHEE	1	6, 9	OH
α-гидрокси-цис-Δ13-докозеновая	22:1	OHDE	1	6, 11	OH
Цис-эйкозеновая	20:1	EE	2	6, 9	-
цис-докозеновая	22:1	DE	2	6, 11	-
α-гидрокси-октадекановая	18:0	OHS	3	-	OH
транс-гексадеценовая	16:1	HD	2	4, 7	-
транс-октадеценовая	18:1	OD	4	6, 7	-
Эйкозановая	20:0	EO	4	-	-
Гексадекановая	16:0	HDO	4	-	-
Октадекановая	18:0	ODO	4	-	-
α-гидрокси-транс-октадеценовая	18:1	tOHOD	3	6, 7	OH

(1) α-производные цис-мононенасыщенных жирных кислот (жирные кислоты по изобретению).

(2) жирные кислоты с двойной связью в цис-конфигурации, но без модификаций по α-углероду.

(3) жирные кислоты с модифицированным α-углеродом, но без двойной связи в цис-конфигурации

(4) жирные кислоты без двойной связи в цис-конфигурации и без модификаций по α-углероду.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. ПРИМЕНЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ И ИХ СОЛЕЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Чтобы определить, применимы ли жирные кислоты по изобретению для профилактики развития опухолевых процессов, была применена животная модель рака. Эта модель состояла из лишенных иммунной системы животных ([Crl:Nu(Ico)-Fox1]) - бестимусных мышей, в которых были инъецированы клетки немикрочитарного рака легкого человека (5×10^6 клеток A549 на одно животное). В контрольной группе (инфицированной раковыми клетками, но нелеченной) начиналось развитие опухолей, которые были видимы спустя несколько дней. Размеры опухолей были измерены в первый раз на 10 день после имплантации опухоли, и продолжали проводить измерения вплоть до 31 дня после имплантации с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухолей был вычислен исходя из следующего уравнения:

$$V = W^2 \times l / 2,$$

где V является объемом опухоли, W является ее шириной, и l является длиной. Были применены профилактические способы лечения против развития рака. Для выполнения этих способов лечения было назначено 400 мг/кг в день в течение 2 недель до инъекции опухолевых клеток. Это лечение было продолжено в течение одного месяца после имплантации опухолевых клеток, и был измерен объем опухолей у животных. Каждая экспериментальная группа состояла из 8 животных. Пероральное применение α-производных цис-мононенасыщенных жирных кислот предотвращало развитие рака (клетки A549 аденокарциномы легкого человека) (Фигура 2). Однако применение насыщенных или транс-мононенасыщенных жирных кислот (как природных, так и α-производных) не предотвращало возникновение рака у лабораторных животных. В связи с этим пришли к заключению, что введение двойной связи в цис-конфигурацию в структуре жирной кислоты является решающим фактором в профилактике и лечении жирными кислотами развития рака. Также наличие модификации по α-углеродному атому значимо и наиболее заметно повышало эффективность профилактики и лечения

развития рака мононенасыщенными жирными кислотами (**Фигура 2**). В этом смысле α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (OHND, OHOD, MOD, AOD, FOD, TFMOD, MOOD, SHOD, MOD11, OHOD11, OHHE и OHDE) оказывали более заметное действие, нежели *цис*-мононенасыщенные жирные кислоты без разновидностей по α -положению (EE, DE, HOD, ODO), насыщенные жирные кислоты той же самой длины (HD, OD, EO) или α -производные жирных кислот, которые не были *цис*-мононенасыщенными (OHS, tOHOD) (см. **Таблицу 1**).

Кроме того, был применен ряд α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот с целью исследования их эффективности в лечении рака. Было выполнено два типа эксперимента. Прежде всего, была исследована зависимость противоопухолевого действия от концентрации. Для выполнения этих экспериментов клетки легкого человека (A549) культивировали в среде RPMI, дополненной 10% эмбриональным бычьим альбумином, 10 mM Нерес (pH 7,4), 2 mM глутамином, 2 г/л бикарбоната, 1 г/л глюкозы, 100 единицами/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина В, при 37°C и в присутствии 5% CO₂. В первой экспериментальной серии эти клетки были обработаны различными концентрациями (0-400 мкМ) OHOD и MOD11, и число клеток было определено проточной цитометрией (**Фигура 3А**). Оба соединения уменьшали рост опухолевых клеток, демонстрируя значения IC₅₀ (концентрации, уменьшающей число жизнеспособных клеток до 50%) в диапазоне от 50 до 100 мкМ после 48 часов инкубации. Дозы от 200 до 400 мкМ приводили к полному исчезновению опухолевых клеток. Во второй серии было исследовано противоопухолевое воздействие на клетки A549 рака легкого при одной концентрации (150 мкМ) и времени, равном 48 часов (**Фигура 3В**). В этих культурах инкубация с 150 мкМ α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот вызывала ингибирование роста опухолевых клеток, указывая на то, что они являются эффективными молекулами для лечения рака. Молекулы с модификациями по α -углероду (независимо от типа модификации) и с двойной связью в *цис*-конфигурации в соответствии с формулой, указанной выше (но не в *транс*-конфигурации), демонстрировали противоопухолевую эффективность. Напротив, молекулы без модификации по α -углероду (EE, DE, HD, OD, EO, HDO, ODO) не демонстрировали противоопухолевую эффективность. Подобным образом, молекулы с двойной связью в *транс*-конфигурации (tOHOD) и без двойной связи (OHS, EO, HDO, ODO, OHS) не обладали противоопухолевой эффективностью. Очевидно, что среди предыдущих молекул некоторые не обладали как модификациями по α -углероду, так и двойной связью в *цис*-конфигурации (EO, HDO, ODO) и не оказывали терапевтического эффекта. Эти результаты демонстрируют, что только лишь жирные кислоты со структурами, соответствующими Формуле I, являются терапевтически эффективными.

Во второй экспериментальной серии, предназначенной исследовать, являются ли эти молекулы эффективными в лечении различных типов опухолей, было изучено действие OHOD при различных концентрациях на человеческие клетки различных типов рака. Эти эксперименты были выполнены, как описано ранее, за исключением того, что клеточные линии M220 и HT-29 культивировали в среде DMEM и линия MDA-MB-231 была инкубирована в среде Leibowitz L-15, дополненной 15% эмбриональным бычьим альбумином. Было обнаружено, что эти молекулы имеют широкий спектр действия, таким образом, они могут быть применены для лечения различных типов рака (легкого, глиомы, простаты, молочной железы, поджелудочной железы, лейкемии, матки, толстой кишки и т.п., **Таблица 2**). При условии что эти молекулы не вызывают серьезных побочных эффектов, могут быть назначены перорально и могут применяться в больших количествах, они могут быть применены в качестве нутрицевтических, а

также фармацевтических препаратов. В зависимости от происхождения опухолевого процесса применение может быть местным (применение на коже активных продуктов для лечения меланомы и других кожных аномалий злокачественной природы), которое можно рассматривать в качестве косметических способов лечения, когда

Таблица 2

Клеточная линия	Тип рака	Механизм действия ¹	Противоопухолевое действие ²
PC3	Рак простаты	P A	+++
LNcaP	Рак простаты	A	+++
MDA-MB-231	Рак молочной железы	A	++
M220	Рак поджелудочной железы	A	++
L1210	Лимфоцитарная лейкемия	A	+++
Jurkat	Лимфоцитарная лейкемия	A	+++
HL-60	Миелоидная лейкемия	P D A	+++
HeLa	Рак шейки матки	A	+++
HT-29	Рак толстой кишки	A	++
C-6	Глиобластома головного мозга	P D	+++
SH-SY5Y	Нейробластома	P	+
A549	Рак легкого	P D	+++
T98G	Глиома	D	+++
A172	Глиома	D	++
A118	Глиома	D	+++
SF-767	Глиома	D	++
U87-MG	Глиома	D	+++
SF-268	Глиома	nd	+++
MCF7	Рак молочной железы	nd	+++
NCI-H460	Рак легкого (CPNM)	nd	+++
IMR90	Нормальные фибробласты	nd	-

¹ P [антипролиферативный], D [дифференцировка], A [апоптоз], nd [не определен]

² + [ингибирование роста], ++ [полная остановка роста], +++ [полное уничтожение опухолевых клеток]

Более того, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот способны индуцировать экспрессию кадгерина. Кадгерин является белком клеточной адгезии. Клетки, экспрессирующие кадгерин, обычно не перемещаются с места их тканевой локализации, так как они прикреплены к окружающим клеткам. Опухолевые клетки, потерявшие способность синтезировать этот белок, могут мигрировать из ткани, в которой они были образованы, в другие ткани организма, где они могут дать начало развитию новых опухолевых очагов посредством процесса, известного как метастазирование. При лечении α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот было обнаружено значительное увеличение уровней кадгерина (Фигура 4). Инвазивная способность раковых клеток была также исследована в модели инвазии в культуральном планшете. В этой модели клеткам дают возможность расти до тех пор, пока они не инвазируют весь субстрат чашки для культивирования. Затем выскабливают поверхность чашки для культивирования и подсчитывают число клеток, инвазирующих эту область в разное время в присутствии или в отсутствие антиметастатического соединения. Как показано на Фигуре 5, клетки рака легкого, культивируемые в присутствии ONOD, имели более низкую инвазивную способность, нежели необработанные клетки. Эти результаты указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть применены для профилактики или лечения развития опухолевых метастазов.

Кроме того, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот препятствуют пролиферации клеток сосудов (см. ниже), что предотвращает образование кровеносных сосудов, необходимых для развития опухоли. Таким образом, эти молекулы могут быть применены в качестве опухолевых антиангиогенных веществ.

Одной важной характеристикой молекул, рассматриваемых в настоящем изобретении,

является способность образовывать различные типы солей. На **Фигуре 6А** и в **Таблице 5** показаны терапевтические эффекты различных α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот и их солей. В этом смысле, возможно, вследствие лучшей абсорбции или распределения этих молекул некоторые из этих соединений оказывают значительно более интенсивное воздействие, чем таковое, продемонстрированное разновидностями свободных жирных кислот, предполагая, что такие соединения предпочтительны при приготовлении лекарственного препарата или разработке терапии для лечения этого заболевания. Специфичность этого воздействия определяется взаимосвязью между дозой и эффектом, которые имеют эти молекулы в отношении объема опухолей человека, имплантированных в животных (**Фигура 6В**). В связи с тем что форма Na-OHOD (натриевая соль OHOD) более эффективна, нежели соответствующая свободная жирная кислота, ее противоопухолевое действие было изучено на лишенных иммунной системы мышцах после ксенотрансплантации различных типов рака человека: лейкемии, рака простаты, рака молочной железы и рака толстой кишки (**Фигура 7**).

В связи с тем что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот имеют совсем другой механизм действия по сравнению с таковым других противоопухолевых фармацевтических препаратов, используемых в настоящее время, комбинирование этих жирных кислот с любым противоопухолевым фармацевтическим препаратом может обуславливать более высокую эффективность и их применение может даже увенчаться успехом в лечении животных, зараженных раковыми опухолями человека. **Фигура 8** демонстрирует эффект Na-OHOD в отдельности и в комбинации с темозоломидом, эрлотинибом, гемцитабином и цисплатином в лечении глиомы человека (рака головного мозга), рака легкого человека и рака поджелудочной железы человека в лишенных иммунной системы мышечных моделях. С одной стороны, было обнаружено, что Na-OHOD является более эффективным, нежели другие фармацевтические препараты, используемые людьми для лечения рака. С другой стороны, комбинация Na-OHOD с любым из этих фармацевтических препаратов приводила к заметному уменьшению объема опухолей и значительно меньшему размеру опухолей, чем после воздействия либо Na-OHOD в отдельности, либо любого из указанного выше противоопухолевого фармацевтического препарата, применяемого в отдельности. Более того, оставшиеся опухоли, обнаруживаемые у большинства животных, леченных Na-OHOD, и практически у всех, леченных двумя молекулами одновременно, состояли из мертвых клеток без способности к регенерации опухоли. Таким образом, можно считать, что эти комбинированные лекарственные воздействия были эффективными в лечении опухолей человека, имплантированных в животных.

Все эти данные указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть применены в (а) профилактике и (b) лечении рака путем их прямого воздействия на опухолевые клетки. Кроме того, они представляют собой вещества широкого спектра действия, так как они препятствуют росту большого разнообразия опухолевых клеток значительно различающихся типов. Поскольку они не являются токсичными, они могут быть применены в популяциях высокого риска, таких как курильщики, люди, подверженные биологическому или радиологическому риску, который может вызывать развитие рака, носители генетических или соматических нарушений, ассоциированных с развитием различных типов опухолей и т.п. Они могут быть также применены для профилактики и лечения процессов метастазирования и ангиогенеза у пациентов, у которых могут развиваться некоторые опухолевые процессы. Эти молекулы могут быть назначены перорально и не проявлять явных токсических эффектов, поэтому они могут быть применены в качестве лекарственных препаратов

или в качестве функциональных продуктов питания. Кроме того, их применение при опухолях кожи может осуществляться местным способом применения.

Пример 2. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения пролиферации васкулярных клеток и других патологий сердца и кровеносных сосудов

5 Проллиферация васкулярных клеток лежит в основе определенных патологий, таких как атеросклероз, кардиомиопатия, гиперплазия сердца, гипертензия и другие патологии сердца и сосудов, а также опухолевый ангиогенез. С целью определения эффективности действия α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот на пролиферацию васкулярных клеток, было изучено воздействие различных жирных кислот на
10 размножение клеток A10, которые являются нормальными васкулярными клетками, происходящими из аорты. Было показано, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот обладают высоким потенциалом в ингибировании гиперпролиферации васкулярных клеток A10. Это воздействие не является токсичным, поскольку число клеток не уменьшалось после добавления соединений, но была предотвращена их
15 пролиферация в присутствии эмбриональной сыворотки, которая содержит молекулы, индуцирующие клеточное размножение. Для культуры клеток A10 была применена среда RPMI 1640, дополненная эмбриональной бычьей сывороткой, используя другие добавки и условия, указанные ранее. Жирные кислоты, перечисленные в **Таблице 1**, были добавлены в культуральную среду, используя два контроля роста. Первый из них
20 не содержал какую-либо жирную кислоту, в то время как второй не содержал жирные кислоты и эмбриональную бычью сыворотку (без сыворотки). Наконец, клетки были посчитаны проточной цитометрией.

α -Производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот в концентрации 200 мкМ индуцировали остановку клеточной пролиферации, подобно той, что была вызвана
25 удалением эмбриональной бычьей сыворотки (которая содержит много клеточных ростовых факторов) (**Фигура 9**). Эти данные указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот являются молекулами, которые могут быть применены для профилактики и лечения атеросклероза, кардиомиопатии, ангиогенеза, зависящего от опухолей, гиперплазии сердца, гипертензии и других связанных с этим
30 патологий посредством лекарственных препаратов или функциональных продуктов питания.

Напротив, жирные кислоты, не имеющие двойных связей или в которых двойная связь имеет транс-конфигурацию, были неэффективными в снижении пролиферации клеток аорты A10. Аналогичным образом, жирные кислоты, не имеющие модификаций
35 по α -углероду, не оказывали значительных воздействий на пролиферацию клеток A10. Напротив, жирные кислоты с двойной связью в *цис*-конфигурации и модификацией по α -углероду оказывали воздействие, независимо от радикала, присоединенного к этому углероду. Опухолевый ангиогенез опосредован пролиферацией васкулярных клеток вокруг раковых клеток. Таким образом, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных
40 кислот являются потенциальными антиангиогенными факторами, которые могут быть применены для предотвращения пролиферации кровеносных сосудов, обеспечивающих питательными веществами только что образованные опухоли.

В другой серии экспериментов была исследована эффективность различных жирных кислот в предотвращении возникновения гипертензии. Гипертензивные крысы (SHR)
45 были лечены α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот и другими жирными кислотами (**Фигура 10**). Крысы SHR являются нормотензивными в течение первых месяцев жизни, пока они не достигнут зрелости и не приобретут гипертензивное состояние (в возрасте между 3 и 4 месяцами). Чтобы определить, способны ли

используемые производные предотвращать развитие гипертензии, крысы SHR в возрасте 10 недель были лечены различными жирными кислотами. В этом возрасте животные являются все еще нормотензивными, имея артериальное давление в диапазоне от 130 до 140 мм рт.ст., которое было измерено в начале лечения. Животные были разделены на экспериментальные группы из 8 животных таким образом, чтобы среднее артериальное давление было схожим во всех группах (средние значения в диапазоне от 128 до 132 мм рт.ст. для всех групп в начале эксперимента). Исследование предотвращения развития гипертензии было выполнено путем назначения дозы 200 мг/кг в день животным в течение 10 недель и измерения их артериального давления в конце лечения. Из **Фигуры 10** видно, что у животных, леченных α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, не развивалась гипертензия, в то время как у нелеченных животных или животных, леченных жирными кислотами, не имеющими структуры, показанной в **Формуле I**, развивалась гипертензия. Этот результат явно отличается от эффекта лечения гипертензии, поскольку профилактика не давала животным страдать от гипертензии в какой-то момент их жизни. Таким образом, профилактика развития гипертензии устраняла все проблемы, связанные с этим состоянием, такие как гипертрофия сердца, риск развития инфаркта миокарда и инсульта, ишемия и т.п. Действительно, у животных, леченных α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, было обнаружено значительное уменьшение массы сердца по сравнению с гипертензивными животными (снижение массы сердца крыс SHR в диапазоне от 2% до 7% для соединений, рассмотренных в настоящем изобретении). Гипертензивные животные испытывали избыточную нагрузку на сердце для компенсации сопротивления току крови в сосудистой системе, поэтому у них обнаруживали гипертрофию сердца. Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут быть применены для лечения различных патологий, связанных с процессами гипертрофии сердца.

В другом эксперименте был применен ряд *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (**Таблица 5**), вновь демонстрируя, что Na-OHOD был более эффективным, нежели OHOD, указывая на то, что замена водорода (H) в позиции **R** на натрий (Na) повышает терапевтическую способность жирной кислоты в лечении гипертензии.

Все эти результаты демонстрируют, что структура, указанная в **Формуле I**, наиболее подходит как для профилактики, так и для лечения патологий, связанных с клеточной пролиферацией сердца и кровеносных сосудов. Эти способы лечения могут быть назначены в виде фармацевтических, нутрицевтических или местных/эстетических препаратов.

Атеросклероз или артериосклероз является патологией, характеризующейся потерей сократительной способности кровеносных сосудов. Эта потеря связана со многими факторами, среди которых - образование отложений в просвете сосуда, что приводит к пролиферации васкулярных клеток, снижению кровотока и вазоконстрикторному и вазодилаторному ответам на действие нейротрансмиттеров (таких как норадреналин) и гормонов. В исследованиях на изолированной аорте крысы в инкубаторе органов было показано, что сила сокращения мускулатуры аорты в ответ на норадреналин очень заметно увеличивалась после предварительной обработки кислотой OHOD. Кроме того, все соединения со структурой **Формулы I** обладали похожим воздействием на мускулатуру сосуда. Эти результаты четко указывают на способность этих соединений предотвращать или лечить атеросклероз и связанные с ним патологии. **Фигура 11** демонстрирует воздействие предварительной обработки *in vitro* (в инкубаторе органов) с помощью OHOD на сократительную способность аорт крыс SHR. **Фигура**

демонстрирует, что сократительная способность, индуцированная норадреналином (NA), была намного выше в аортах крыс, предварительно обработанных этой жирной кислотой. Это результат четко указывает на то, что пластичность сосудистой ткани значительно увеличивается ($p < 0,05$) в присутствии этого соединения, демонстрируя пригодность α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот для профилактики и лечения атеросклероза и других сердечно-сосудистых патологий. Кроме того, улучшение сократительного ответа аорты указывает на то, что эти соединения могут также быть применены для поддержания нормального состояния сосудистой ткани у здоровых субъектов и в лечении поврежденных сосудов у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями.

Пример 3. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения кожных патологий и связанных с этим заболеваний

Аномалии продукции меланина обуславливают аномалии кожной пигментации и могут быть по своему характеру патологическими. С целью исследования возможного применения α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот в лечении меланопатий была измерена продукция меланина в мышечных меланоцитах (клетках B16). Клетки были вскрыты с помощью NaOH, и концентрация меланина была определена абсорбционной спектроскопией при 490 нм, используя способ, ранее описанный Curto et al. (1999). 100 мкМ концентрация этих соединений в течение 48 часов вызывала снижение содержания меланина в клетках B16 (**Фигура 12**). Эти результаты указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот со структурой Формулы I могут быть применены для лечения дерматологических проблем, имеющих отношение к патологиям пигментации. Подобно данным по лечению других патологий жирные кислоты, которые не обладали структурой Формулы I, не оказывали значимого воздействия на регуляцию содержания меланина (**Фигура 12**).

Фигура 12 также демонстрирует воздействие α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (100 мкМ, 48 часов) на пролиферацию адипоцитов (клеток 3T3-L1). Молекулы, обладающие структурой Формулы I, ингибировали рост клеток 3T3-L1, в то время как молекулы, не обладающие структурой Формулы I, не оказывали значимого воздействия на пролиферацию адипоцитов (**Фигура 12**). Эти типы жировых клеток могут расти аномально или размножаться аномально в подкожных областях (гипертрофия или гиперплазия адипоцитов). Аномальный рост может вызывать патологические процессы различных типов, таких как ожирение и целлюлит.

Представленные в настоящем документе результаты указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть применены для профилактики и лечения патологий, таких как ожирение, целлюлит, псориаз, пигментация кожи и тому подобное. Принимая во внимание индивидуальную типологию кожи и нижележащих слоев, лечение некоторых из этих патологий может быть выполнено местным способом, таким образом, эти молекулы могут быть применены в качестве косметических средств. Эти патологии могут также быть подвергнуты лечению с помощью фармакологических и нутрицевтических препаратов.

Пример 4. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения метаболических патологий (метаболических патологий: гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабета) и ожирения

Метаболические заболевания образуют сеть патологий, характеризующихся накоплением или дефицитом определенных молекул (холестерина, триглицеридов, глюкозы и т.п.) в сыворотке крови или тканях. Эти изменения являются отражением дисфункций, которые обычно связаны с ошибками в активности определенных

ферментов или в контроле этих белков. Среди наиболее важных метабологических патологий - гиперхолестеринемия (повышенные уровни холестерина), гипертриглицеридемия (повышенные уровни триглицеридов) и диабет (повышенные уровни глюкозы). Эти патологии имеют высокие показатели уровня заболеваемости, распространенности

5 заболевания и смертности, следовательно, лечение является необходимостью первого порядка. В этом смысле, лечение с помощью ОНОД приводило к значительному снижению уровней холестерина, триглицеридов и глюкозы (**Фигура 13**) у крыс Sprague-Dawley (самок весом 300 г). Для этих экспериментов дозу указанной жирной кислоты (0, 200, 400 и 600 мг/кг) вводили ежедневно пероральным способом. В конце лечения

10 (30 дней) был осуществлен забор образцов крови из контрольных и леченных животных (n=6), и были определены уровни холестерина, триглицеридов и глюкозы, используя стандартные колориметрические способы. Наблюдаемые эффекты зависели от дозы, указывая на то, что эффект был специфическим.

В дополнительном эксперименте было исследовано действие различных молекул в

15 единственной дозе (600 мг/кг). В этих исследованиях α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот продемонстрировали значимое воздействие на снижение холестерина, триглицеридов и глюкозы. Напротив, молекулы, которые не обладали структурой, указанной в Формуле I, не оказывали терапевтического воздействия (**Фигура 13**). В этом смысле, модификация по α -углероду и двойная связь

20 в *цис*-конфигурации являются ключевыми факторами формирования терапевтического эффекта, указанного выше. Аналогичные молекулы, которые не обладают структурой Формулы I, не были эффективными в качестве терапевтических средств лечения гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии и диабета (**Фигура 14**). И наконец, было исследовано воздействие α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот на

25 предотвращение ожирения. С этой целью была применена модель крысиного ожирения, индуцированного общественным питанием, где гиперкалорийный корм весьма резко увеличивал вес животных. Были сформированы различные экспериментальные группы (см. **Таблицу 3**), каждая из которых состояла из 6 самок крыс Wistar Kyoto весом 250-300 г. Все животные получали стандартное питание в течение 2 недель. При этом 2 из

30 всех групп получали перорально профилактическое предварительное лечение наполнителем, и другие группы получали 300 мг/кг жирных кислот, указанных ниже. Впоследствии одну из контрольных групп содержали в условиях стандартного питания (контроль некалорийного питания) и других кормили общественным питанием (контроль ожирения). Группы леченных животных кормили общественным питанием.

35 Профилактическое предварительное лечение поддерживалось для всех групп. После двух недель этих видов питания, в группе контроля некалорийного питания вес животных увеличился в среднем на 16 ± 16 г, в то время как в группе контроля ожирения вес животных увеличился в среднем на 43 ± 17 г (статистически значимое различие, $p < 0,01$). Крысы, леченные α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот,

40 демонстрировали увеличение веса, подобно таковому в группе контроля некалорийного питания и значимо меньшего такового в группе контроля ожирения ($p < 0,05$), питающейся тем же. Таким образом, животные, предварительно леченные этими жирными кислотами, демонстрировали заметный и статистически значимо меньший прирост массы тела по сравнению с животными, получавшими такое же общественное

45 питание. В связи с этим, применение определенных производных (солей) жирных кислот, рассмотренных в этом изобретении, приводило к более выраженному терапевтическому воздействию в некоторых случаях со снижением уровней холестерина (СНО) и триглицеридов (TG), которое было более значительным, чем таковое, наблюдаемое

после лечения свободными жирными кислотами (Таблица 5).

Вес леченных животных был статистически меньше веса крыс из группы контроля ожирения и статистически неразличимый от такового у крыс из группы контроля некалорийного питания. Эти результаты, наряду с профилактикой прибавки веса (Таблица 3) и ингибированием роста адипоцитов (Фигура 12), указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот являются активнодействующими молекулами в лечении и профилактике развития ожирения. Следует подчеркнуть, что в этой экспериментальной серии на животных (Таблица 5) не было предварительного лечения, что указывает на то, что Na-OHOD был более эффективным в лечении ожирения, чем OHOD. При этом как соли, так и другие фармацевтически приемлемые формы для лечения этих и других метаболических патологий демонстрировали высокую терапевтическую активность таким образом, что любая из них может быть применена или выбрана среди тех форм, которые проявляют лучшую фармакологическую безопасность.

Таблица 3

ПОЛУЧАЕМОЕ ПИТАНИЕ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ	Исходный вес	Конечный вес
Стандартное питание+лечение наполнителем (контроль некалорийного питания)	264±21	280±16
Общественное питание+лечение наполнителем (контроль ожирения)	265±14	308±17
Общественное питание+лечение OHND	259±21	275±19*
Общественное питание+лечение OHOD	269±11	284±13*
Общественное питание+лечение MOD	255±12	268±12*
Общественное питание+лечение AOD	249±14	272±15*
Общественное питание+лечение FOD	261±13	279±13*
Общественное питание+лечение TFMOD	262±12	278±14*
Общественное питание+лечение MOOD	251±21	263±22*
Общественное питание+лечение SHOD	254±16	269±16*
Общественное питание+лечение MOD11	257±16	274±18*
Общественное питание+лечение OHOD11	256±10	269±12*
Общественное питание+лечение OHDE	252±9	264±11*
Общественное питание+лечение OHDE	260±12	273±15*
Общественное питание+лечение EE	258±14	301±17‡
Общественное питание+лечение DE	253±11	305±12‡
Общественное питание+лечение HDO	255±15	299±15‡
Общественное питание+лечение ODO	259±19	301±18‡
Общественное питание+лечение EO	262±12	298±12‡
Общественное питание+лечение HD	260±16	309±15‡
Общественное питание+лечение OD	259±14	311±17‡
Общественное питание+лечение OHS	251±10	314±11‡
Общественное питание+лечение tOHOD	258±17	312±19‡

* Значимо ниже, чем в группе контроля ожирения ($p < 0,05$)

‡ Статистически неразличимый от группы контроля ожирения ($p < 0,05$)

Сочетание нескольких этих патологий вызывает процесс, названный метаболическим синдромом. Результаты, представленные в этом разделе, отчетливо указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот являются чрезвычайно активными молекулами для профилактики и лечения гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, диабета, метаболического синдрома, ожирения и других метаболических патологий посредством применения фармацевтических или нутрицевтических препаратов.

Пример 5. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения нейродегенеративных патологий

Нейродегенеративные процессы вызывают ряд заболеваний с различными проявлениями, но общей характерной чертой является дегенерация клеток центральной и/или периферической нервной системы. Некоторые из этих нейродегенеративных процессов, таких как болезнь Альцгеймера или сенильная деменция, влекут за собой значительное снижение познавательной способности пациентов. Другие вызывают изменения двигательной активности, такие как болезнь Паркинсона и различные типы склероза. Наконец, определенные нейродегенеративные патологии могут приводить к

процессам, вызывающим слепоту, проблемы со слухом, нарушение ориентации в пространстве, изменение эмоциональной реакции и т.п.

Примером хорошо охарактеризованного нейродегенеративного нарушения является болезнь Альцгеймера, при которой наблюдали образование сенильных бляшек, сформированных остатками мембранных белков (например, β -амилоидного пептида), которые ошибочно подвергаются процессингу и которые накапливаются снаружи клеток, и переплетением нейрофиламентов, которые оказываются внутри клеток. Этот процесс связан с изменениями метаболизма холестерина и последующими изменениями уровней холестерина в мембранах (Raid et al., 2007). Известно, что развитие этого заболевания связано с другими патологиями, при которых были описаны изменения липидного метаболизма и, в частности, холестерина, как, например, с таковыми сердечно-сосудистого типа.

Склероз и другие нейродегенеративные процессы относят к «демиелинизации», конечным результатом которой является потеря липидов в оболочке нейронального аксона с последующими изменениями процесса проведения электрических сигналов. Миелин представляет собой липидный слой, который окружает аксоны многих нейронов и формируется рядом спиральных слоев плазматической мембраны глиальных клеток (Шванновских клеток). В связи с этим понятно, что липиды играют очень важную роль в развитии нейродегенеративных патологий.

Ввиду того что липиды со структурой Формулы I способны снижать уровни холестерина (Фигуры 13 и 14), предполагают, что они могут быть эффективными в лечении нейродегенеративных заболеваний. В исследовании было показано, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот высокоэффективны в профилактике нейродегенерации в животной модели (Фигура 15). Используемые в этом исследовании трансгенные мыши, у которых сверхэкспрессирован ApoB-100, характеризуются ранним возникновением синдрома, подобного болезни Альцгеймера, со значительной утратой познавательного процесса и цитогистологическими характеристиками, подобно тому, что обнаруживают при нейродегенеративных процессах у людей. У этих животных лечение α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот вызывало заметные и значительные улучшения когнитивных параметров. Для этого исследования мыши ($n=8$) были лечены в течение 6 месяцев жирной кислотой в дозировке 100 мг/кг, назначенной перорально 5 раз в неделю (с понедельника по пятницу). Контрольная группа состояла из мышей ($n=8$), леченных наполнителем (водой) способом, подобным таковому в исследуемой группе. С целью определения познавательной способности животных были применены радиальный лабиринт и тест Миллера, и познавательная способность контрольных животных (нелеченных) была принята за 100% (Wise et al., 2007; Patil et al., 2006). Познавательная способность животных, леченных различными типами жирных кислот, представляла собой положительную динамику в процентах, измеренную при выполнении этих тестов. Эти результаты указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть применены для лечения нейродегенеративных патологий, таких как болезнь Альцгеймера, различные типы склероза, болезнь Паркинсона и т.п., посредством применения фармацевтических и нутрицевтических препаратов.

Пример 6. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения поражений нервных волокон и боли

Центральная нервная система, после жировой ткани, содержит наибольшее количество липидов в организме. Из этого можно сделать вывод, что липиды очень важны для нейронов и глиальных клеток. В этом контексте жирные кислоты,

рассмотренные в настоящем изобретении, могут предотвращать и лечить функциональные симптомы, такие как, например, потеря двигательной функции, невропатическая боль или спастичность, индуцированные поражением нервного волокна. В целях пролонгирования высвобождения ОНОД и подобных жирных кислот после единичной инъекции соединения, они были связаны с бычьим сывороточным альбумином (комплексы альбумин-жирная кислота или А-АГ, где АГ может представлять собой ОНОД), и наблюдали восстановление двигательной активности (Фигура 16).

Как показано на **Фигуре 16А**, комплекс альбумин-ОНОД в дозировке 4 мМ в 10 мкл, введенный интратекальным способом, в основном, повышает восстановление функции произвольной двигательной активности с 4 по 28 день после поражения нервного волокна у крыс при сравнении с животными, леченными солевым раствором или комплексом альбумин-олеиновая кислота. Эти результаты демонстрируют, что комплекс альбумин-ОНОД был эффективен для нейрорегенерации и нейротрофии во время хронической фазы поражения нервного волокна. Этот эффект может быть обусловлен индукцией спрутинга отростков нейронов, необходимого для восстановления связей, утраченных при поражении нервного волокна. Воздействие ОНОД (натриевой соли) на дифференцировку и распространение отростков клеток U118 показано на **Фигуре 16В**, где продемонстрированы нейрорегенерационная и нейротрофическая способности α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот.

Исследования *in vivo* также продемонстрировали, что применение комплекса А-АГ может ингибировать изменения чувствительности и сенсомоторной функции, следовательно, он может найти свое применение в лечении изменений ноцицепции и боли. В частности, у крыс, леченных альбумином-ОНОД (4 мМ, 10 мкл интратекальным способом), выявлено более выраженное ингибирование временной суммации подошвенного сгибательного рефлекса передней большеберцовой мышцы через 28 дней после поражения нервного волокна по сравнению с крысами, леченными солевым раствором или альбумином-олеиновой кислотой (**Фигура 17**). Эти результаты позволяют предположить, что комплексы альбумин-ОНОД могут быть высокоэффективными в лечении хронической боли.

Таким образом, выполненные исследования указывают на то, что молекулы, включенные в настоящее изобретение, могут быть применены для профилактики возникновения двигательного паралича и в лечении невропатической боли и спастичности, происходящих вследствие поражений нервных волокон.

Принимая во внимание вышеприведенные данные, лекарственные препараты, основанные на комплексе А-АГ, могут обеспечить возможность лечения поражений нервных волокон, особенно травматических поражений.

В частном варианте осуществления изобретения альбумин выбран из природного или рекомбинантного альбумина человеческого, бычьего, мышинового или кроличьего происхождения или овальбумина и лактальбумина, более предпочтительно, используемый альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин или бычий сывороточный альбумин, такой, какой был применен в примерах настоящего документа. Все эти альбумины имеют схожие структуры и функции. Например, сравнение последовательности бычьего альбумина и человеческого альбумина выявило 76% сходство по аминокислотной последовательности. Сходство увеличивается до 88%, когда принимаются во внимание консервативные изменения.

Для этих исследований комплекс альбумин-жирная кислота (А-АГ) был приготовлен в растворе 2% (вес/объем) альбумина и олеиновой кислоты, или ОНОД был добавлен

до конечной концентрации 78 мМ. Был приготовлен раствор 50% альбумина-жирной кислоты (1:1), в концентрации 78 мМ, растворенных в солевом растворе.

Это воздействие на восстановление двигательной активности после поражения нервных волокон может быть объяснено нейротрофическим действием на липидную мембрану неповрежденных нейронов (например, Kim et al., J. Gen Physiol. 2000; 115(3): 287-304), в частности, у основания нейритов, обуславливая дендритный рост, повышенную регуляцию GAP-43 и белка, ассоциированного с микротрубочками (MAP-2, Tabernero, Lavado et al., 2001; Rodriguez-Rodriguez et al., 2004). Альбуминовый рецептор, мегалин, был идентифицирован в мембране олигодендроцитов, в частности в спинном мозге (Wicher et al., J. Neurol. Res. 2006; 83(5):864-73).

Воздействие на центральную чувствительность к вредным стимулам после поражения нервных волокон может быть объяснено регуляцией астроглиоза при участии липидной мембраны путем ингибирования щелевых контактов под действием олеиновой кислоты (Lavado et al., J. Neurochem. 1997; 69(2):71-8) или путем редукции реактивной морфологии астроцитов под действием альбумина (Manning and Sntheimer, Glia 1997; 20(2):163-72).

Пример 7. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения процессов воспаления

Тканевые и клеточные процессы воспаления характеризуются действием провоспалительных цитокинов (интерлейкина-4, -6, -8, -10, TNF- α и т.п.), высвобождаемых клетками иммунной системы (лимфоцитами, нейтрофилами, моноцитами, макрофагами и т.п.) после стимуляции, вызванной патогеном (инфекцией) или антигенной агрессией. Процессы воспаления вызывают широкий спектр заболеваний, среди которых - сердечно-сосудистые, системные заболевания, заболевания опорно-двигательного аппарата, старение и респираторные заболевания, такие как астма, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ) и различные типы воспалений. Это неконтролируемое высвобождение провоспалительных цитокинов, в основном, обусловлено патологической активацией транскрипционного фактора NF κ B (Barnes et al., 1997).

В клеточной модели воспаления (моноциты U937 в культуре, стимулированной бактериальным липополисахаридом, LPS) α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (250 мкМ, 72 ч) в значительной степени ингибировали экспрессию важнейших провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- α). Напротив, соединения, не обладающие структурой Формулы I, не ингибировали экспрессию этих провоспалительных цитокинов (**Фигура 18**).

В дополнительном исследовании по высвобождению различных провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10) и TNF- α в моноцитах U937, стимулированных бактериальным липополисахаридом (LPS), было обнаружено заметное снижение уровней этих молекул после обработки ОННД в концентрации 250 мкМ и в условиях 72 ч инкубации (**Таблица 4**). Воздействие α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот (250 мкМ, 6 ч) на активность и экспрессию циклооксигеназ COX-1 и COX-2 было исследовано в той же системе. Эти жирные кислоты значительно ингибировали активность COX-1 (**Фигура 19А**) и экспрессию COX-2 (**Фигура 19В**). Напротив, соединения, которые не обладали структурой Формулы I, не ингибировали экспрессию этих провоспалительных цитокинов (**Фигура 19**).

Эти результаты указывают на то, что α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть эффективными в лечении аутоиммунного воспалительного заболевания, известного под названием ревматоидный артрит, путем ингибирования продукции провоспалительных цитокинов, уровни которых заметно увеличиваются у

пациентов, страдающих ревматоидным артритом. Ингибирование функции COX-1 и COX-2 этими жирными кислотами указывает на то, что эти соединения пригодны для лечения боли и воспаления. Эти жирные кислоты могут рассматриваться в качестве нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (NSAIDs) нового поколения. Таким образом, ингибирование активности функций COX-1 и COX-2 указывает на то, что эти жирные кислоты могут также быть применены для лечения или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и снижать риск возникновения ишемических состояний, таких как инфаркт миокарда. Таким образом, в связи с важным ингибированием экспрессии провоспалительных цитокинов α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот, они могут быть применены для профилактики и лечения воспаления и протекающих из него процессов, таких как боль и ревматоидный артрит, как на системном, так и на местном уровне, и посредством применения фармацевтических, нутрицевтических и местных/косметических препаратов.

Таблица 4

Ингибирование высвобождения провоспалительных цитокинов под действием ОННД

Цитокин	Контроль (пг/мл)	LPS (пг/мл)	LPS + ОННД (пг/мл)
IL-1b	12 $\pm$ 2	132 $\pm$ 2	41 $\pm$ 5
IL-6	24 $\pm$ 3	1072 $\pm$ 4	68 $\pm$ 8
IL-8	345 $\pm$ 7	967 $\pm$ 8	529 $\pm$ 7
IL-10	32 $\pm$ 1	315 $\pm$ 9	53 $\pm$ 3
TNF- α	15 $\pm$ 6	1504 $\pm$ 7	65 $\pm$ 9

$p < 0,001$. Среднее значение $\pm$ стандартная ошибка 6 экспериментов, выполненных трижды

Пример 8. Применение жирных кислот по изобретению для профилактики и/или лечения инфекционных патологий

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) вызван инфицированием пикорнавирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Этот вирус обладает липидной оболочкой, и целостность вирусной оболочки необходима для слияния с мембранами клеток человека. α -Производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот модифицируют структуру модельных мембран, подобных таковой у вируса СПИДа (Фигура 20), таким образом, что они могут быть применены для лечения этого заболевания.

Связывание ВИЧ с клетками-хозяевами также опосредовано рецептором CD4. Этот белок эукариотической клетки локализован в специфических областях клеточной мембраны, известных под названием «мембранные плоты». α -Производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот разрушают структуру «мембранных плотов», таким образом, они препятствуют вирусно-клеточному взаимодействию, необходимому для возникновения и распространения инфекции (Фигура 21). Таким образом, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут быть применены для профилактики и лечения СПИДа.

Малярия, подобно СПИДу, является инфекционным заболеванием, которое, в данном случае, вызывается простейшим, известным под названием *Plasmodium falciparum*. Этот организм обладает очень быстрым клеточным делением, следовательно, ему постоянно необходимо синтезировать ДНК. Для синтеза ДНК требуются высокие уровни тетрагидрофолата, который выступает в качестве кофермента для некоторых ферментов, которые продуцируют нуклеотиды для синтеза ДНК. Ферментом, который образует тетрагидрофолат, является дигидрофолатредуктаза (DHFR). Таким образом, ингибиторы DHFR, такие как метотрексат, в настоящее время используются для лечения малярии (Nduati et al. 2008). α -Производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот индуцируют очень заметное снижение этого фермента, что приводит к значительному падению уровней DHFR (Фигура 22), следовательно, они могут проявлять важную активность против развития малярии. По сравнению с фармацевтическими препаратами,

такими как метотрексат, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот имеют два преимущества. Во-первых, они обладают меньшей токсичностью. Во-вторых, понижение экспрессии фермента является гораздо более эффективным механизмом действия, нежели его ингибирование (что приводит к высоким уровням фермента, который может активироваться, в конце лечения). Таким образом, α -производные *цис*-мононенасыщенных жирных кислот могут представлять собой эффективные лекарственные средства для лечения малярии.

Кроме того, вещества, которые ингибируют продукцию тетрагидрофолата, являются эффективными антибактериальными средствами. Этот факт наряду с данными, представленными в этом примере по эффективности действия α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот против развития инфекционных процессов различных типов, указывает на то, что эти молекулы могут быть эффективными средствами для профилактики или лечения инфекционных патологий.

Пример 9. Применение жирных кислот по изобретению и различных солей для профилактики и/или лечения различных патологий

Определенные атомы в заданных положениях в молекуле с фармакологической активностью могут изменять ее абсорбцию, распределение в организме или ее взаимодействие с клеточными макромолекулами. Это может повлечь за собой изменения как в положительном, так и отрицательном направлении, терапевтической эффективности активного ингредиента. В Таблице 5 показаны потенциальные терапевтические эффективности различных солей α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот для лечения рака, метаболопатий (гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии), ожирения и гипертензии. В этом смысле, оказалось возможным продемонстрировать, что натриевая соль OHOD (Na-OHOD) является более эффективной, нежели свободная жирная кислота, в отношении регрессирования различных патологий. То же самое было обнаружено с применением Na-DEPOD по сравнению с DEPOD. Таким образом, в приготовлении лекарственных препаратов с α -производными *цис*-мононенасыщенных жирных кислот лучше использовать натриевые производные этих веществ.

Таблица 5

Терапевтические эффекты различных производных α -производных *цис*-мононенасыщенных жирных кислот и их солей при различных патологиях

		IC ₅₀		% от контроля		Вес тела (гр)	РА (контроль
		A549	SF767	CHO	TG	(контроль=311 гр)	214 мм рт.ст.)
35	OHOD	62	71	55	38	292	146
	Na-OHOD	47	52	51	32	281	128
	OMe-OHOD	94	107	71	64	299	155
	EE-OHOD	79	68	62	47	295	161
	NH3-OHOD	81	85	59	62	290	149
	ACOD	153	179	59	53	301	157
40	Na-ACOD	124	132	49	35	298	166
	OMe- ACOD	246	214	86	74	296	152
	EE- ACOD	185	176	72	56	294	158
	MOOD	61	73	65	64	279	142
	Na-MOOD	77	91	63	68	272	131
	OMe-MOOD	149	128	77	69	296	143
45	EE-MOOD	168	195	64	66	297	154
	DEPOD	57	99	58	43	301	147
	Na-DEPOD	32	104	45	37	298	159

OMe-DEPOD	66	43	63	45	293	175
EE-DEPOD	77	82	69	49	295	168

ОНОД: α -гидрокси-цис- Δ^9 -октадеценовая кислота; АСОД: α -ацетил-цис- Δ^9 -октадеценовая кислота; МООД: α -метокси-цис- Δ^9 -октадеценовая кислота; DEPOD: α -диэтил-фосфатидил-цис- Δ^9 -октадеценовая кислота. Атом или молекула, которые замещают R в Формуле I, представляют собой натрий (с префиксом «Na»), сложный метиловый эфир (OMe), сложный этиловый эфир (EE), аммоний (NH₃) или водород (без префикса). Параметром, измеряемым для определения противоопухолевого потенциала, был IC₅₀ (концентрация, уменьшающая наполовину число клеток) в опухолевых клетках A549 и SF767. Значения представлены в виде микромолярных концентраций (мкМ). Во второй колонке представлены уровни холестерина (CHO) и триглицеридов (TG) в процентах по сравнению с необработанными контролями (100%). Крысы получали суточную дозу в количестве 600 мг/кг веществ, указанных в таблице (для получения других подробностей по лечению смотри текст). В третьей колонке представлен вес тела (г) крыс, получающих общественное питание в течение 2 недель. Контрольные крысы, которые весили 311 г к концу лечения (среднее значение по 6 животным), получали наполнитель (воду), в то время как леченные животные получали ежедневно 300 мг/кг веществ, указанных в таблице. РА: артериальное давление (мм рт.ст.). Артериальное давление измеряли у гипертензивных крыс после 8-дневного лечения каждым из указанных соединений (400 мг/кг). Как указано в шапке таблицы, среднее значение РА нелеченных крыс составляло 214 мм рт.ст. Во всех экспериментальных сериях с животными, представленными в этой таблице, лечение всегда было пероральным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Alemany R, Perona JS, Sánchez-Domínguez JM, Montero E, Cañizares J, Brezan R, Escribá PV and Ruiz-Gutiérrez V (2007). G protein-coupled
5 receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. *BBA Biomembr.* **1768**:964-975.
2. Barnes PJ, Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**:1066-71.
- 10 3. Buda C, Dey I, Balogh N, Horvath LI, Maderspach K, Juhasz M, Yeo YK, Farkas T (1994). Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**:8234-8238.
- 15 4. Curto EV, Kwong C, Hersmerdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ, Jr., Dooley TP (1999). *Biochem Pharmacol* **57**:663-672.
5. Escriba PV, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. (1995). Disruption of cellular
20 signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:7595-7599.
6. Escriba PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas T, García-Sevilla JA (1997). Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions:
25 nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:11375-11380.
7. Escribá PV (2006). Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular
30 medicine. *Trends Mol. Med.* **12**:34-43.
8. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquets X, Horváth I, Barceló-Coblijn G (2008). Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell.*
35 *Mol. Med.* **12**:829-875.
9. Martínez JO, Casas J F, Alemany R, Prades J, Nagy T, Baamonde C, Kasprzyk P, Terés S, Saus C, Escribá PV. (2005). Membrane structure modulation,
40 protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of minerval. *Mol Pharmacol* **67**:531-40.

10. Nduati et al. (2008). Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol Res* **102**: 1227-1234.
11. Patil CS, Singh VP, Kulkarni SK (2006). Modulatory effect of Sildefanil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacological Reports* **58**: 373-380.
12. Raid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T (2007). Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med* **11**:383-392.
13. Stender S, Dyerberg J (2004). Influence of trans fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.* **48**:61-66.
14. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Litchman AH (2007). Combination of Rimobant and Donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1805-1812.
15. Yang, Q, Alemany, R, Casas, J, Kitajka, K, Lanier, SM, Escribá PV (2005). Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **68**:210-7.

Формула изобретения

1. Соединение Формулы I:
 $\text{цис-COOR-XCH}-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_3$,
где (a) и (b) могут принимать любое значение от 0 до 14, (X) выбирают из: OH, NH₂, CH₃, F, F₃C, HS, O-CH₃, PO₄(CH₂-CH₃)₂ и CH₃COO, и (R) представляет собой натрий (Na).
2. Соединение Формулы I по п.1, выбранное из: натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-OHOD), натриевой соли α -ацетил-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-ACOD), натриевой соли α -метокси-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-MOOD) и натриевой соли α -диэтил-фосфатидил-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-DEPOD).
3. Применение соединения Формулы I по п.1 отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с другим соединением, для приготовления фармацевтической и/или нутрицевтической композиции для профилактики и/или лечения ожирения, гипертензии и/или рака.
4. Применение соединения Формулы I по п.3, выбранного из: натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-OHOD), натриевой соли α -ацетил-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-ACOD), натриевой соли α -метокси-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-MOOD) и натриевой соли α -диэтил-фосфатидил-цис- Δ^9 -октадеценовой кислоты (Na-DEPOD).
5. Применение соединения Формулы I по п.3 отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с другим соединением, для приготовления фармацевтической и/или нутрицевтической композиции для профилактики и/или лечения рака.

6. Применение соединения натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) по п.3 отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с другим соединением для создания фармацевтической и/или нутрицевтической композиции для профилактики и/или лечения рака, ожирения или гипертензии.

5 7. Применение соединения натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) по п.6 в комбинации, по меньшей мере, с другим соединением, выбранным из: темозоломида, эрлотиниба, гемцитабина и цисплатина для создания фармацевтической и/или нутрицевтической композиции для профилактики и/или лечения рака.

10 8. Фармацевтическая и/или нутрицевтическая композиция для профилактики и/или лечения ожирения, гипертензии и/или рака, содержащая терапевтически эффективное количество соединения Формулы I по п.1 и, по меньшей мере, второе соединение с терапевтической активностью или эксципиент.

15 9. Фармацевтическая и/или нутрицевтическая композиция по п.8 для профилактики и/или лечения рака.

10. Фармацевтическая и/или нутрицевтическая композиция по п.8, содержащая натриевую соль α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) и альбумин.

11. Фармацевтическая и/или нутрицевтическая композиция по п.8, содержащая натриевую соль α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) и/или α -гидрокси-
20 цис- Δ 9-октадеценовую кислоту (OHOD) и, по меньшей мере, другое соединение с терапевтической активностью, выбранное из: темозоломида, эрлотиниба, гемцитабина и цисплатина.

12. Косметический, не терапевтический, способ улучшения кожных проявлений, включающий применение на коже эффективного количества, по меньшей мере,
25 соединения Формулы I по п.1.

13. Способ по п.12, где соединения Формулы I выбраны из группы: натриевая соль α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD), натриевая соль α -ацетил-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-ACOD), натриевая соль α -метокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-MOOD), натриевая соль α -диэтил-фосфатидил-цис- Δ 9-октадеценовой
30 кислоты (Na-DEPOD).

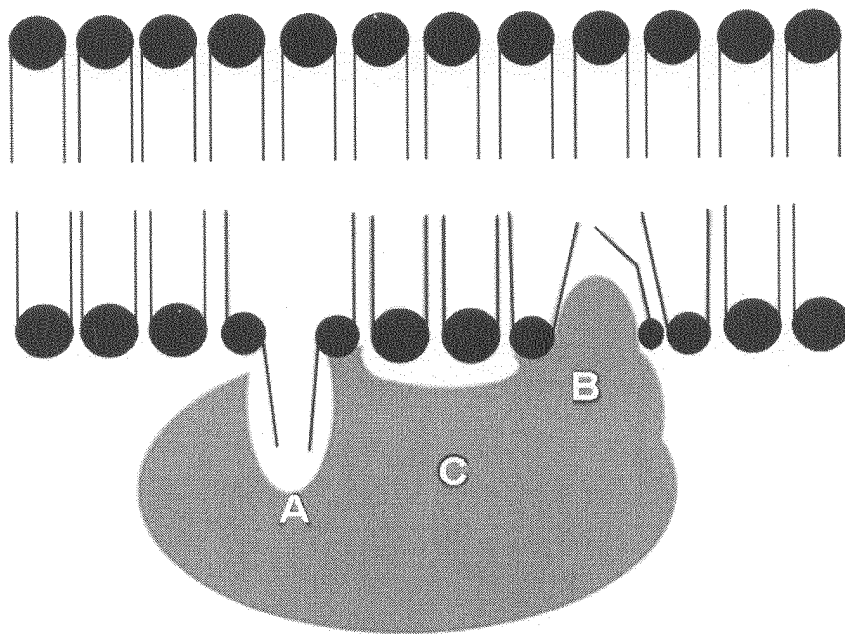
14. Способ по п.12, где соединения Формулы I применяют местным способом.

15. Способ для профилактики и/или терапевтического лечения заболеваний у людей и животных, где общая этиология связана со структурными и/или функциональными изменениями липидов, расположенных в клеточной мембране, включающий введение
35 пациенту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного фармацевтически приемлемого соединения Формулы I по п.1 отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с другим соединением, для профилактики и лечения ожирения, гипертензии и/или рака.

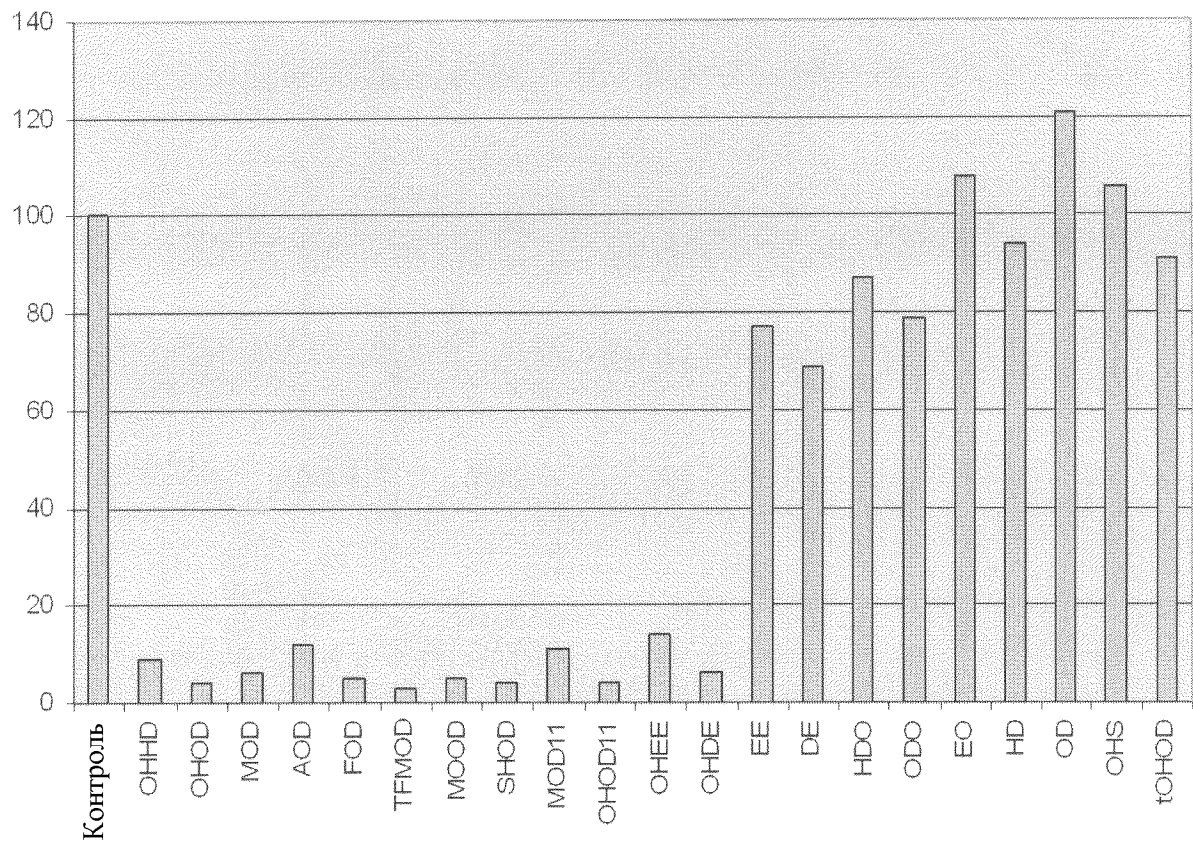
16. Способ по п.15, для профилактики и/или лечения рака.

40 17. Способ для профилактики и/или лечения рака, ожирения или гипертензии по п.15, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с одним другим соединением.

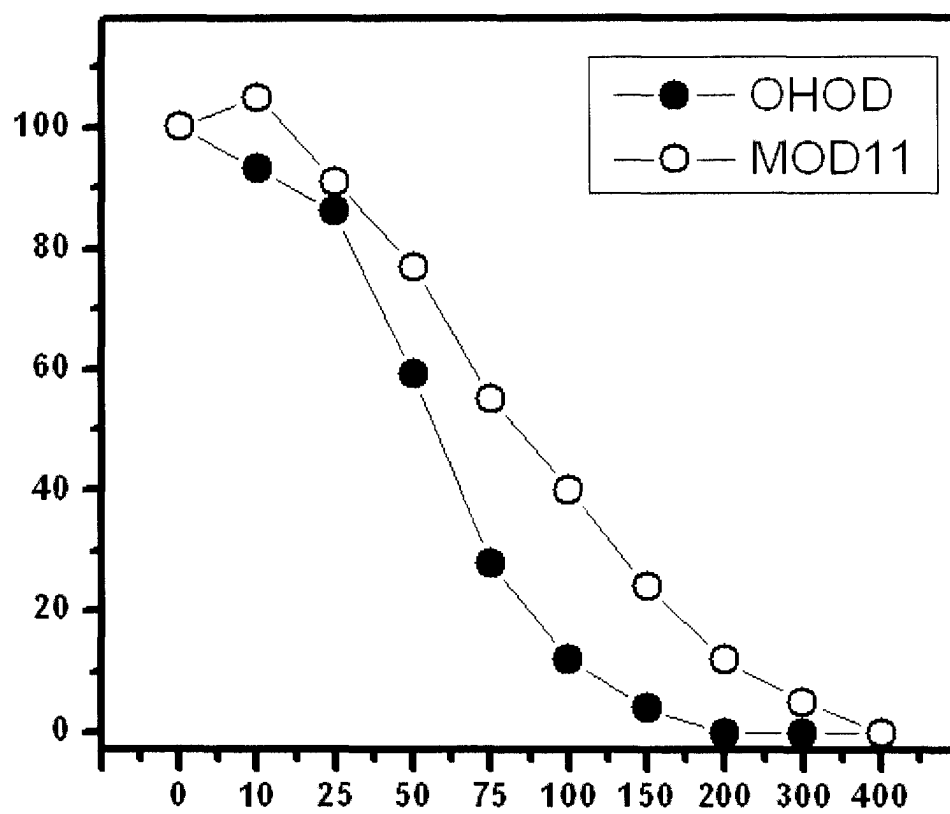
18. Способ для профилактики и/или лечения рака по п.17, включающий введение
45 пациенту терапевтически эффективного количества соединения натриевой соли α -гидрокси-цис- Δ 9-октадеценовой кислоты (Na-OHOD) в комбинации, по меньшей мере, с одним соединением, выбранным из: темозоломида, эрлотиниба, гемцитабина и цисплатина.



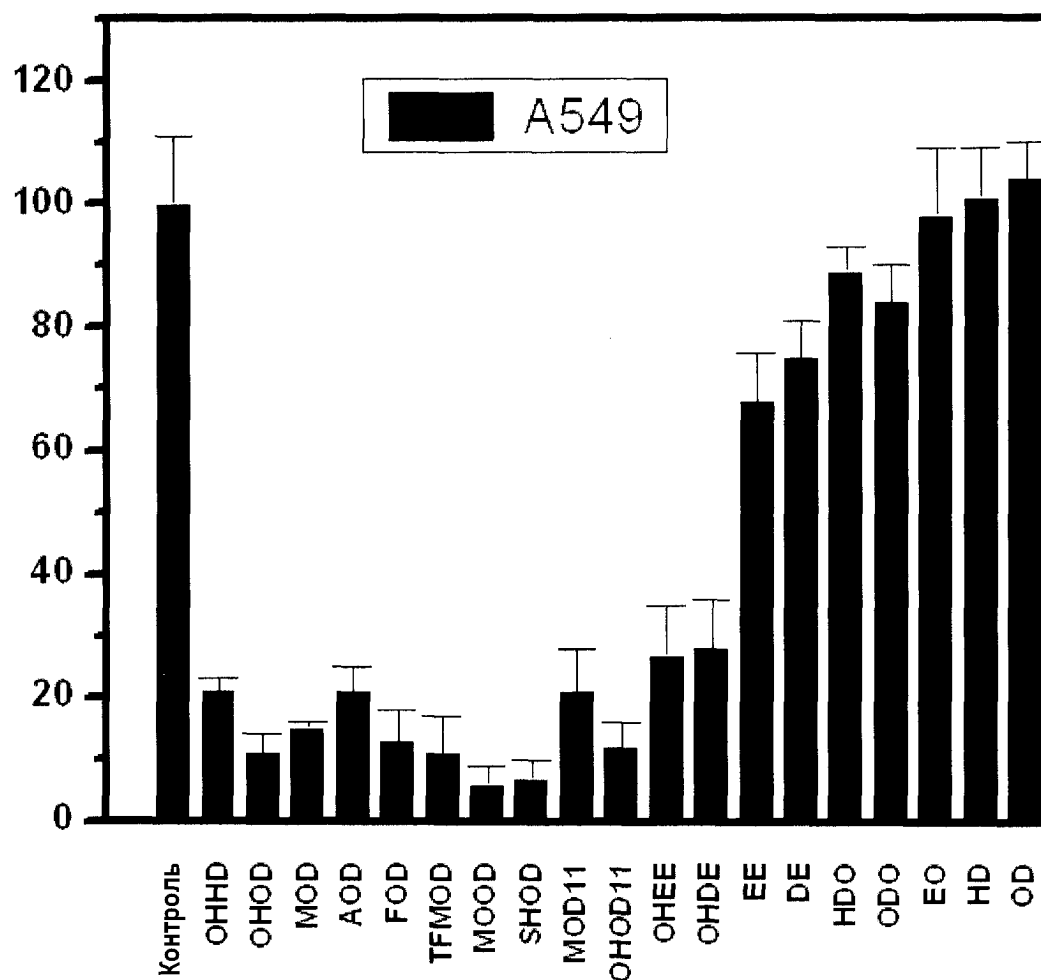
Фиг. 1



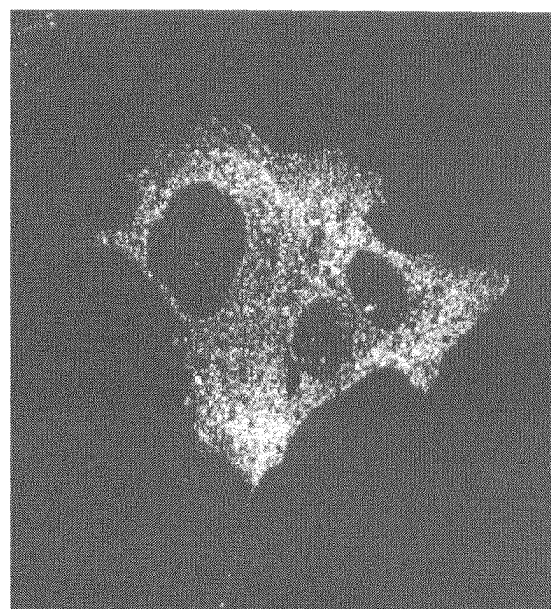
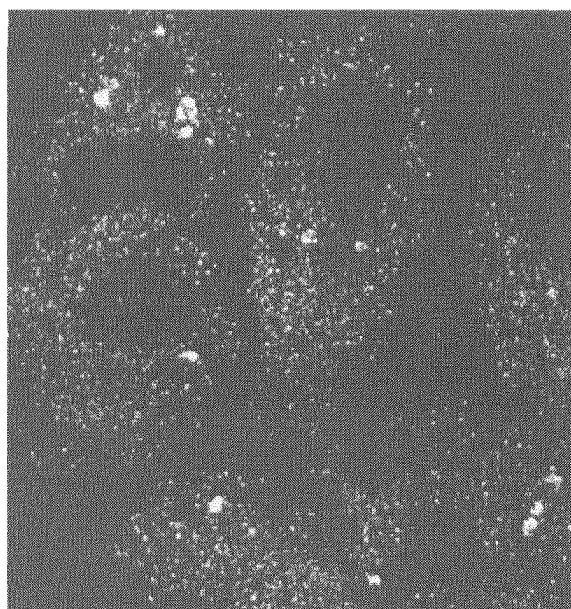
Фиг. 2



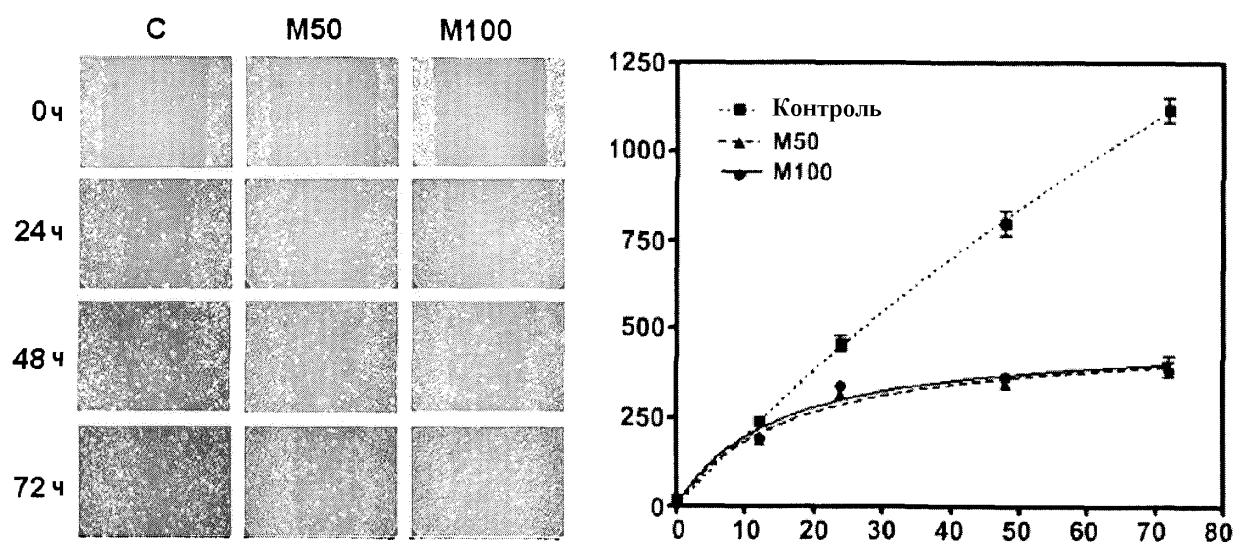
Фиг. 3А



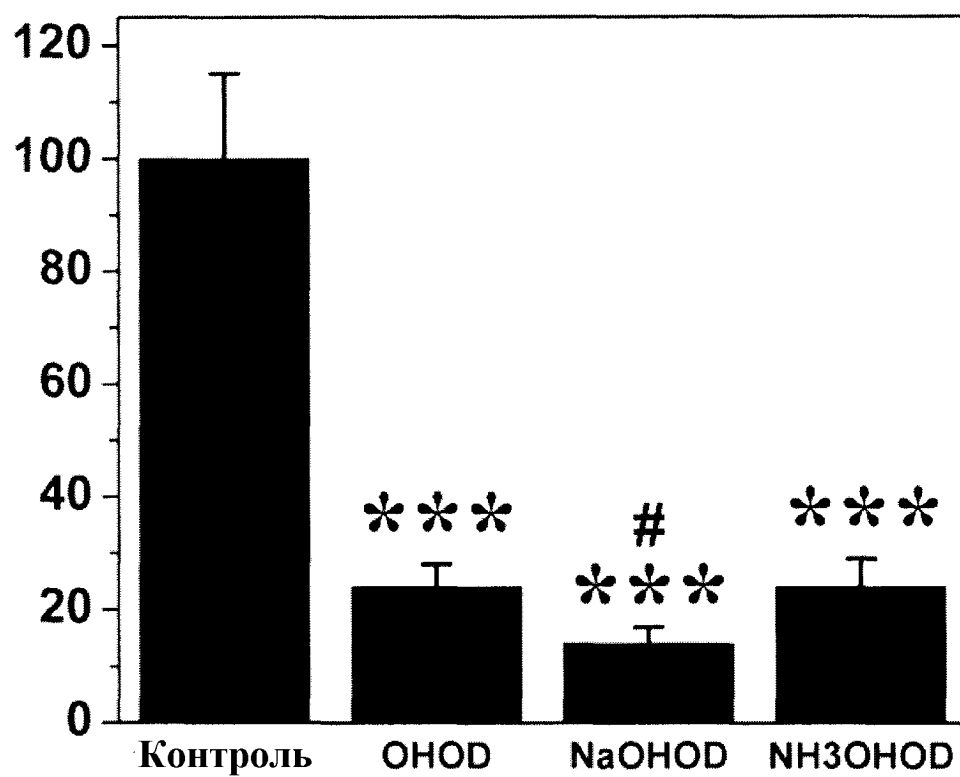
Фиг. 3В



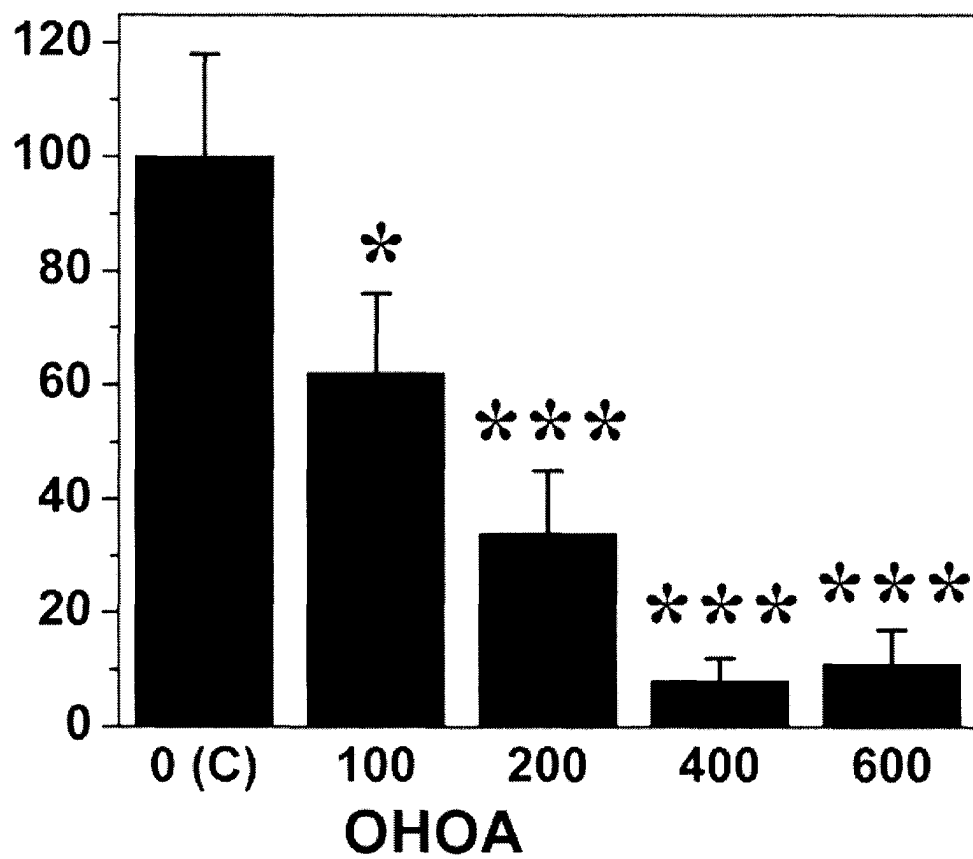
Фиг. 4



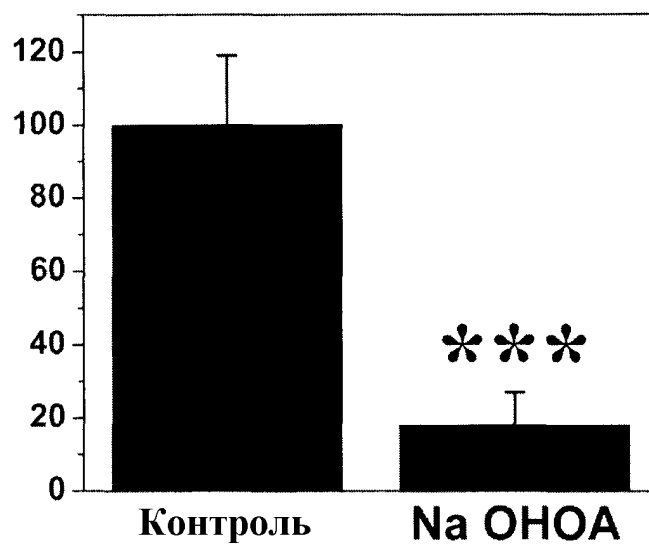
Фиг. 5



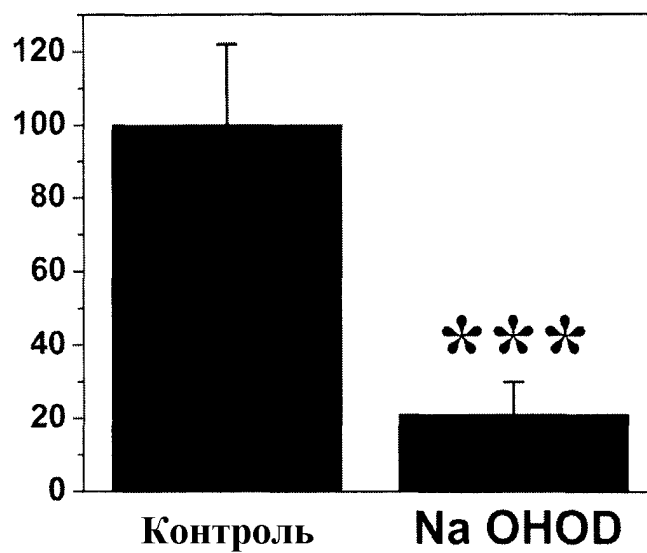
Фиг. 6А



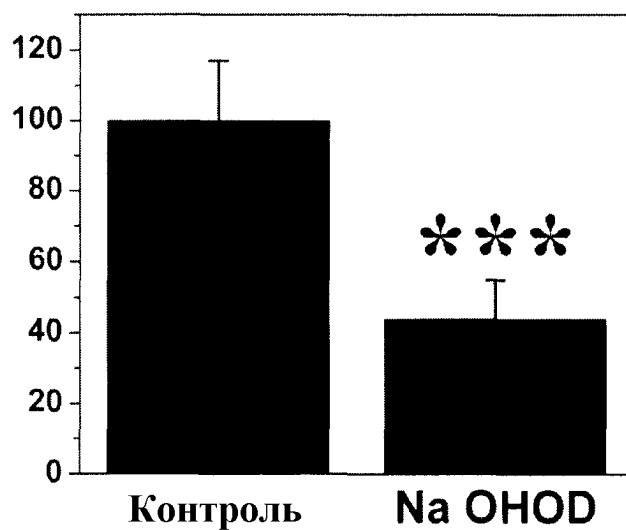
Фиг. 6В



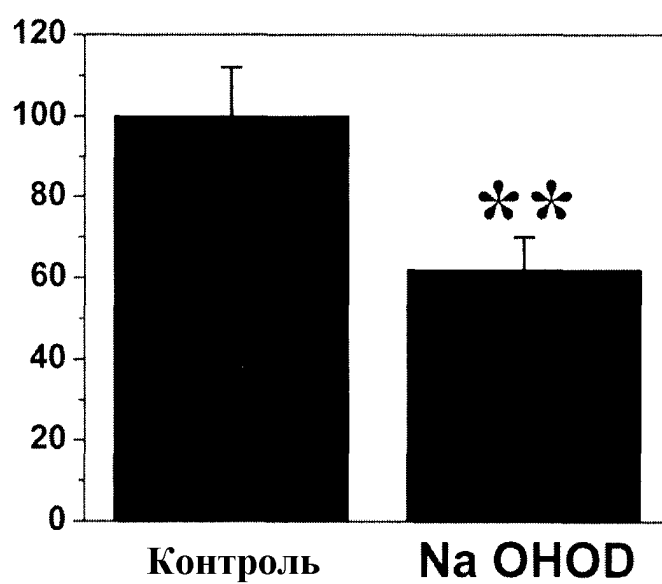
Фиг. 7А



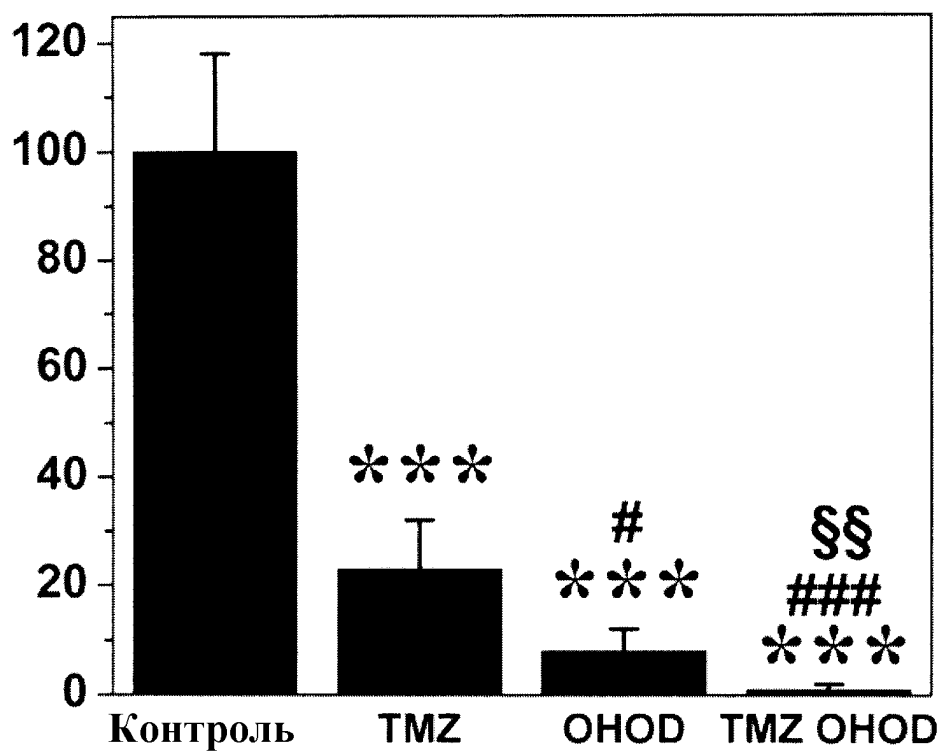
Фиг. 7В



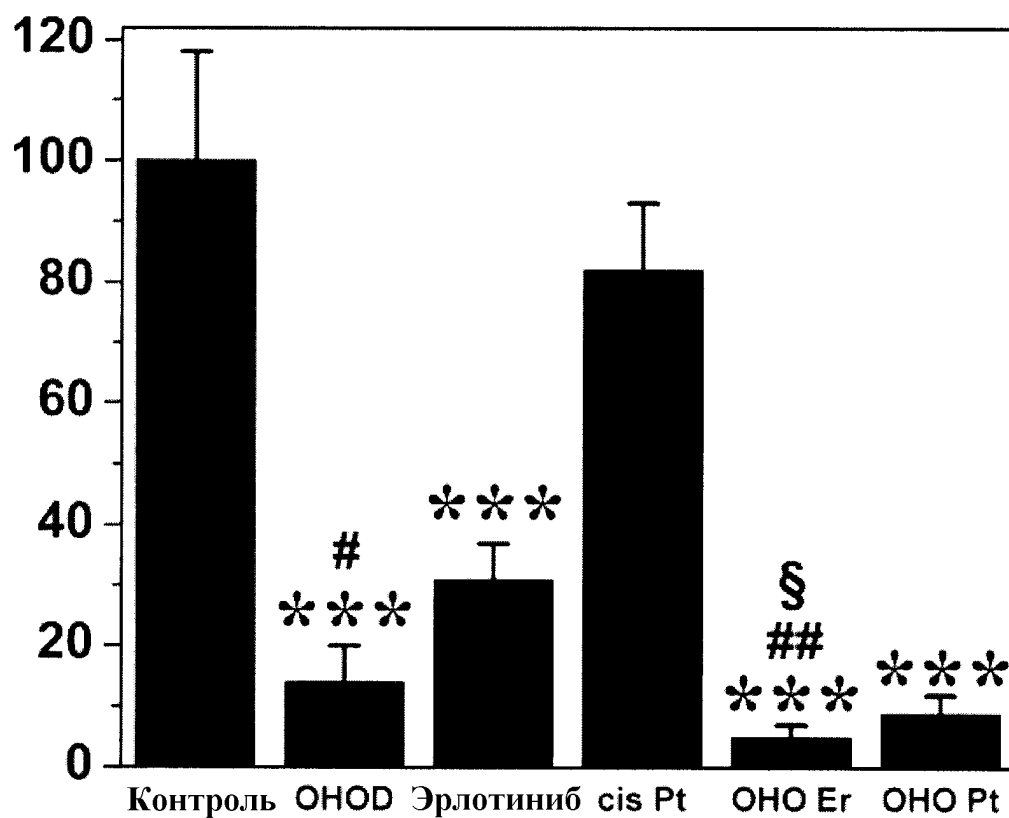
Фиг. 7С



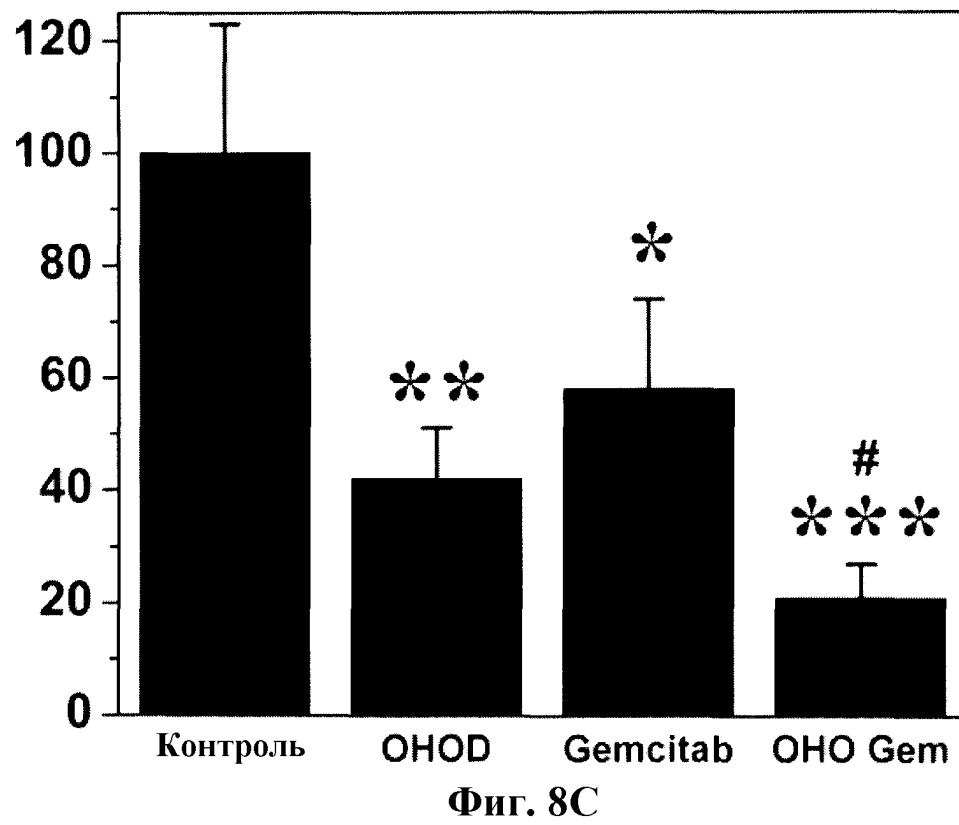
Фиг. 7D

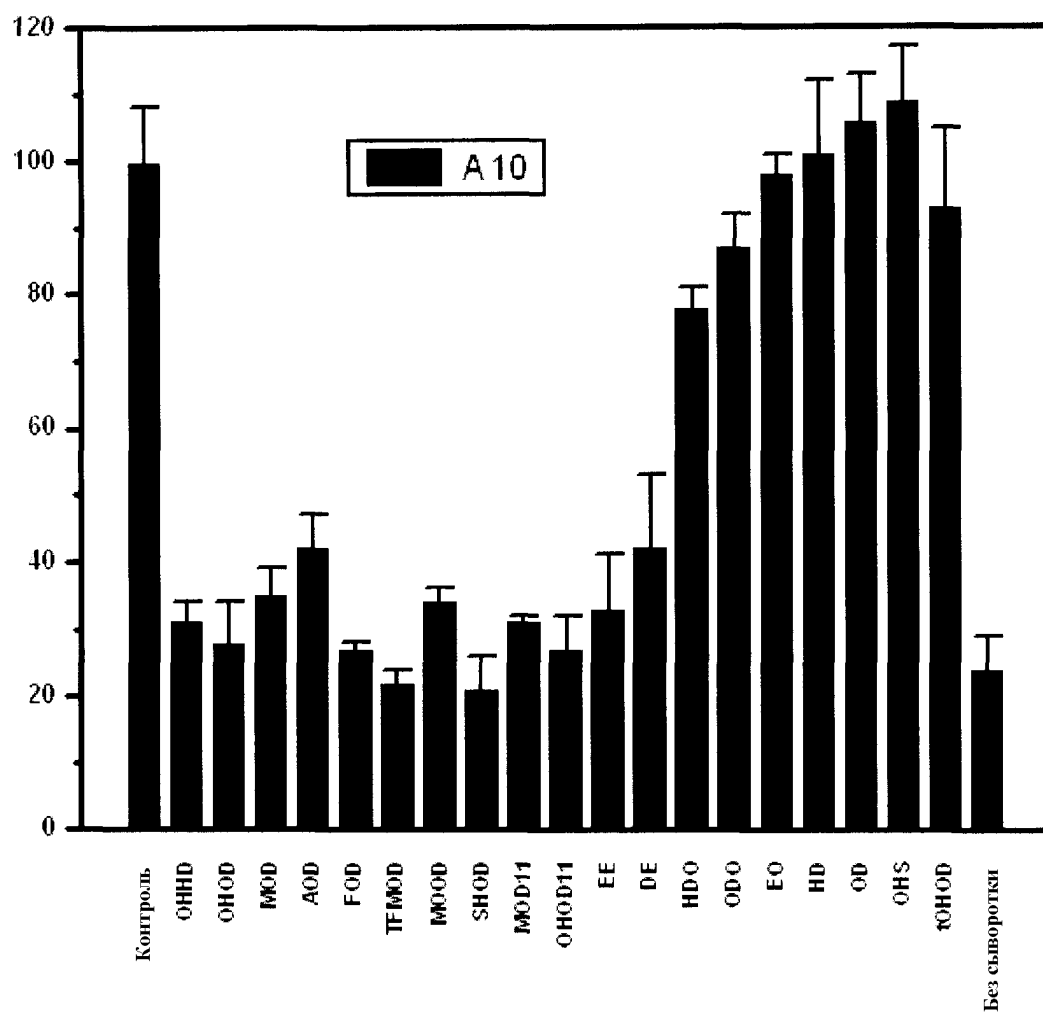


Фиг. 8А

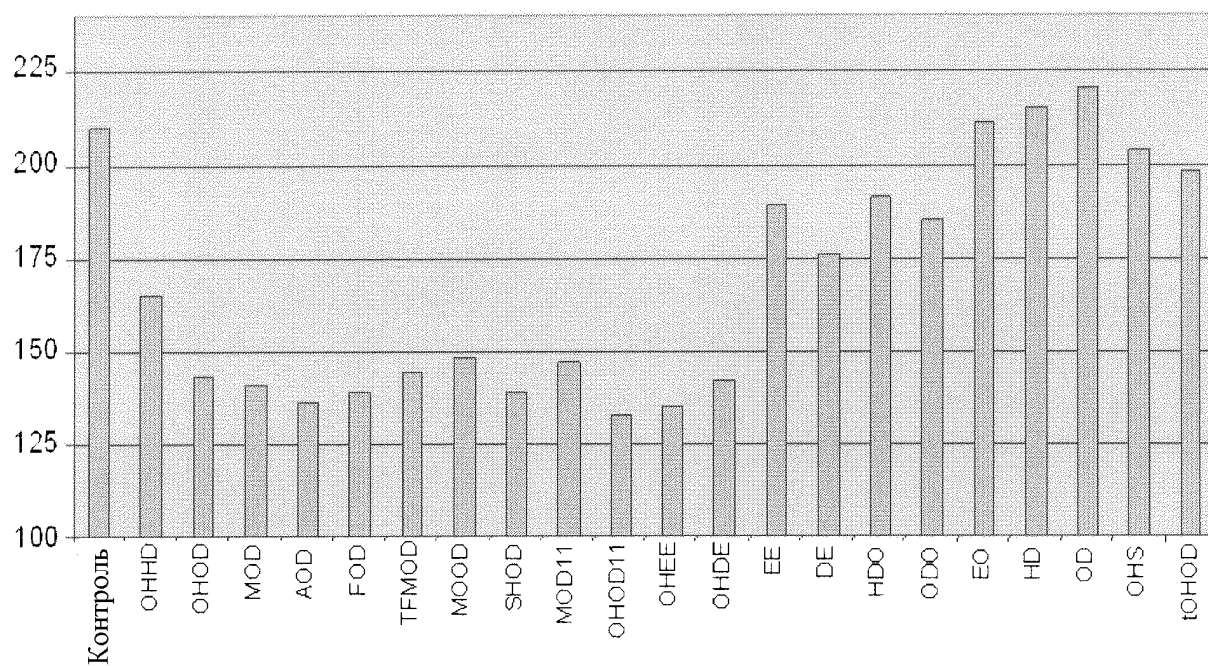


Фиг. 8В

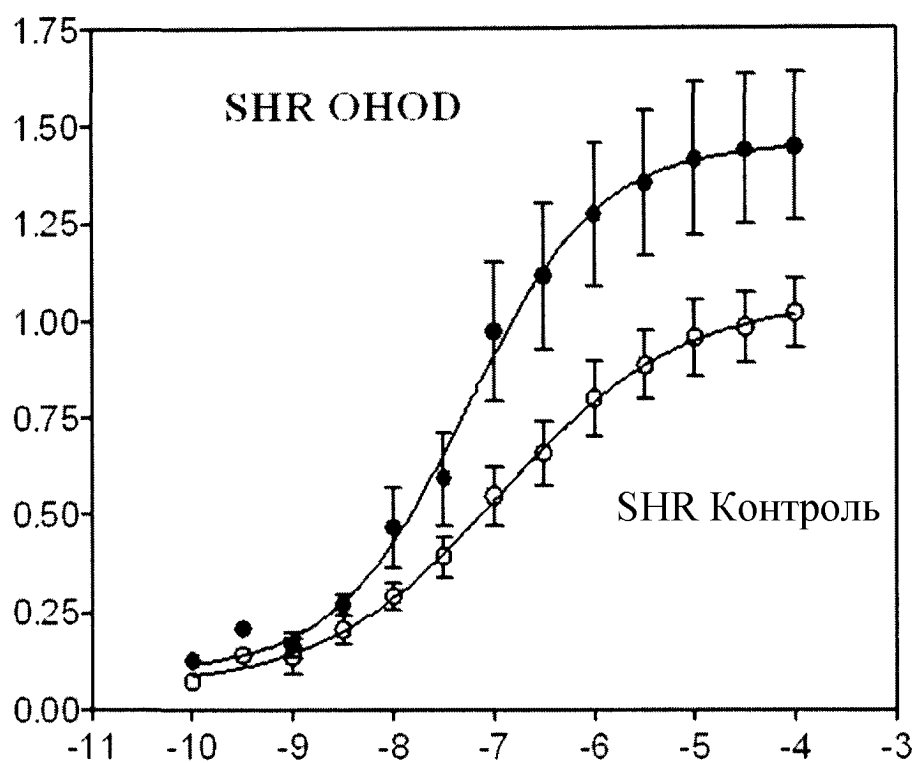




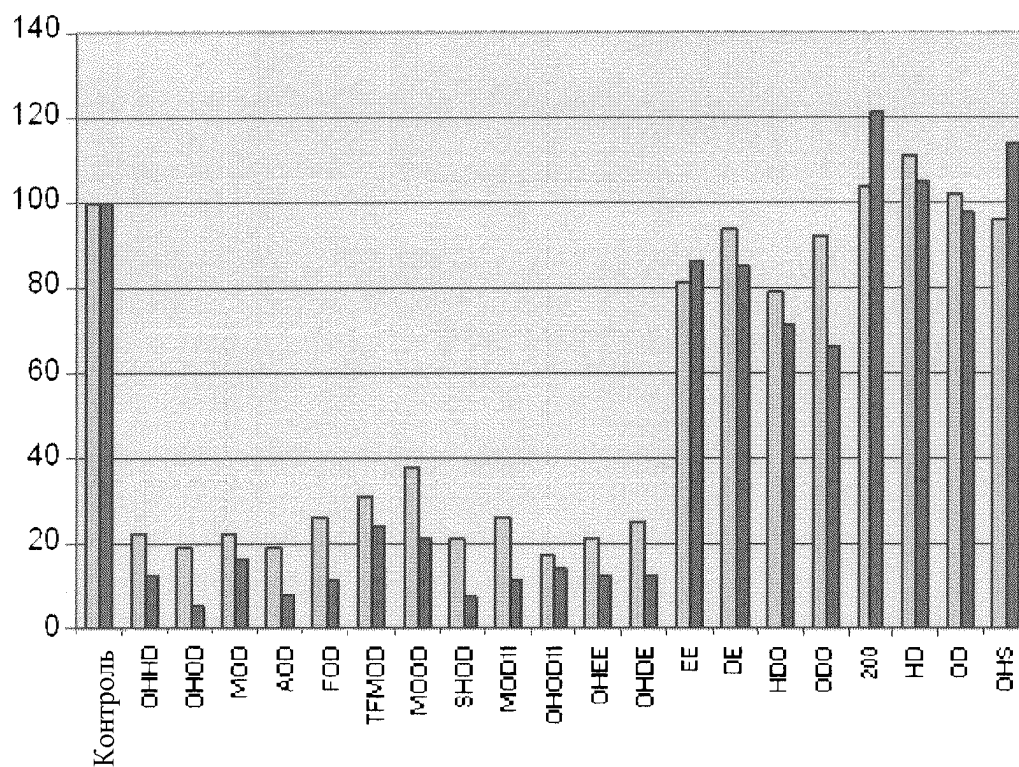
Фиг. 9



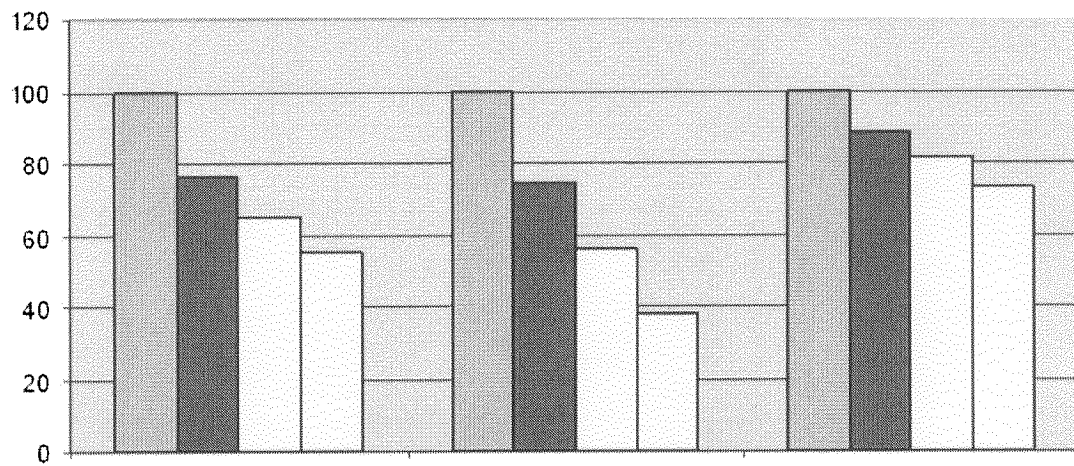
Фиг. 10



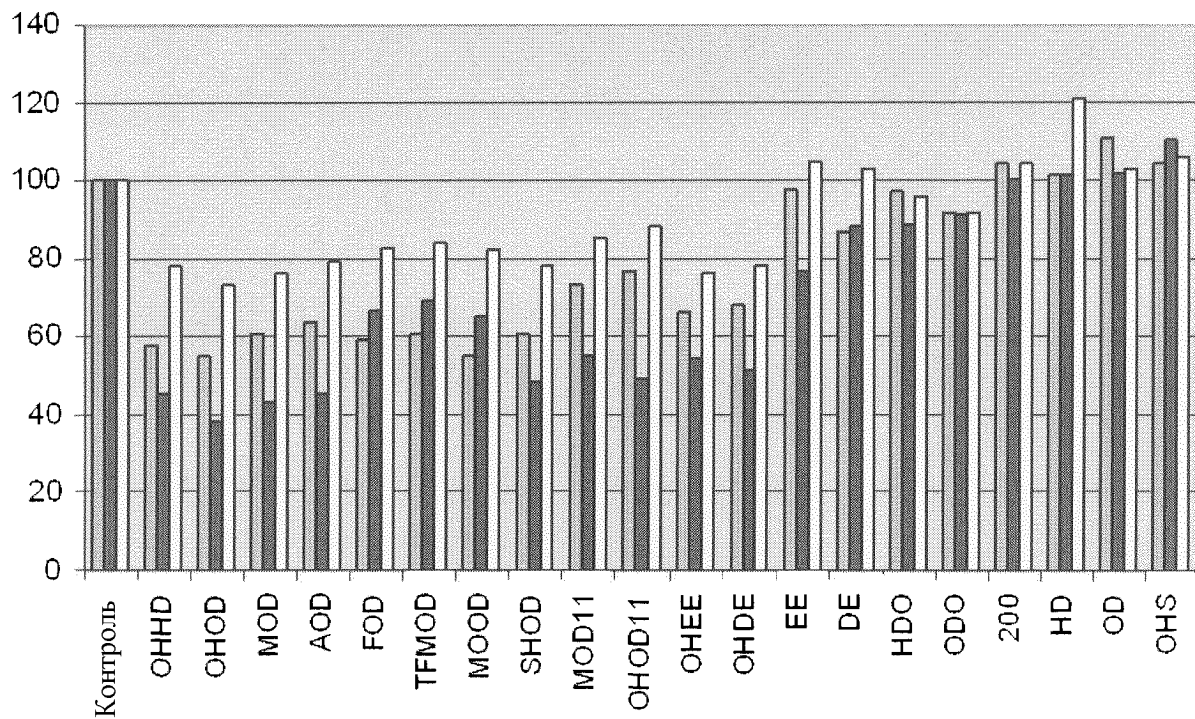
Фиг. 11



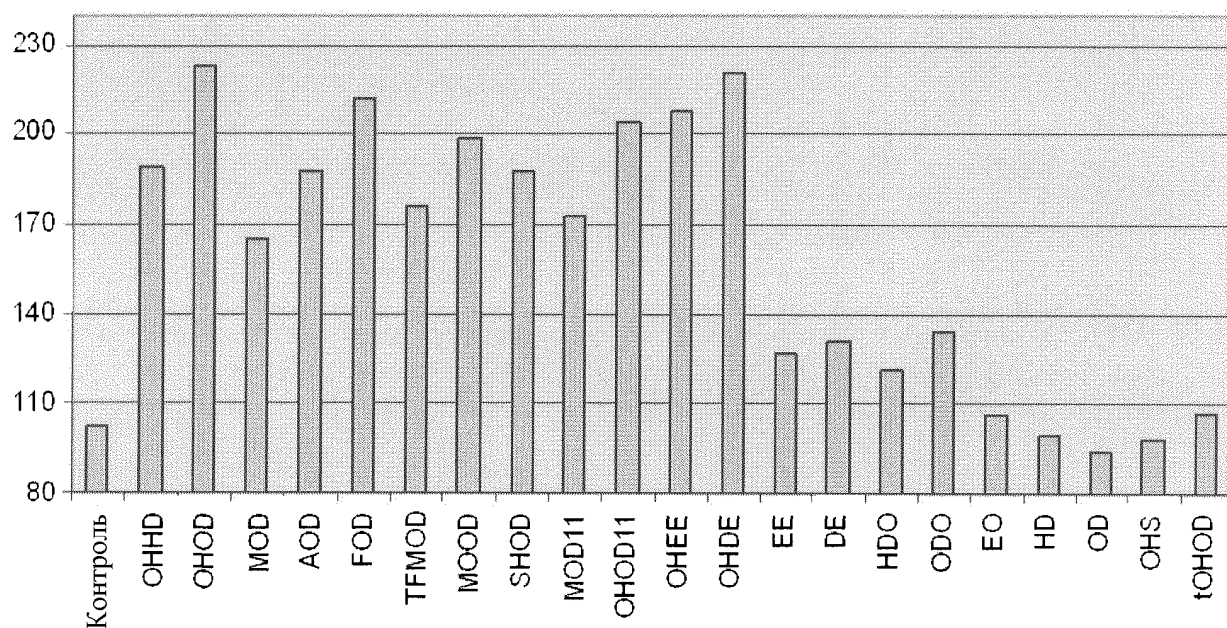
Фиг. 12



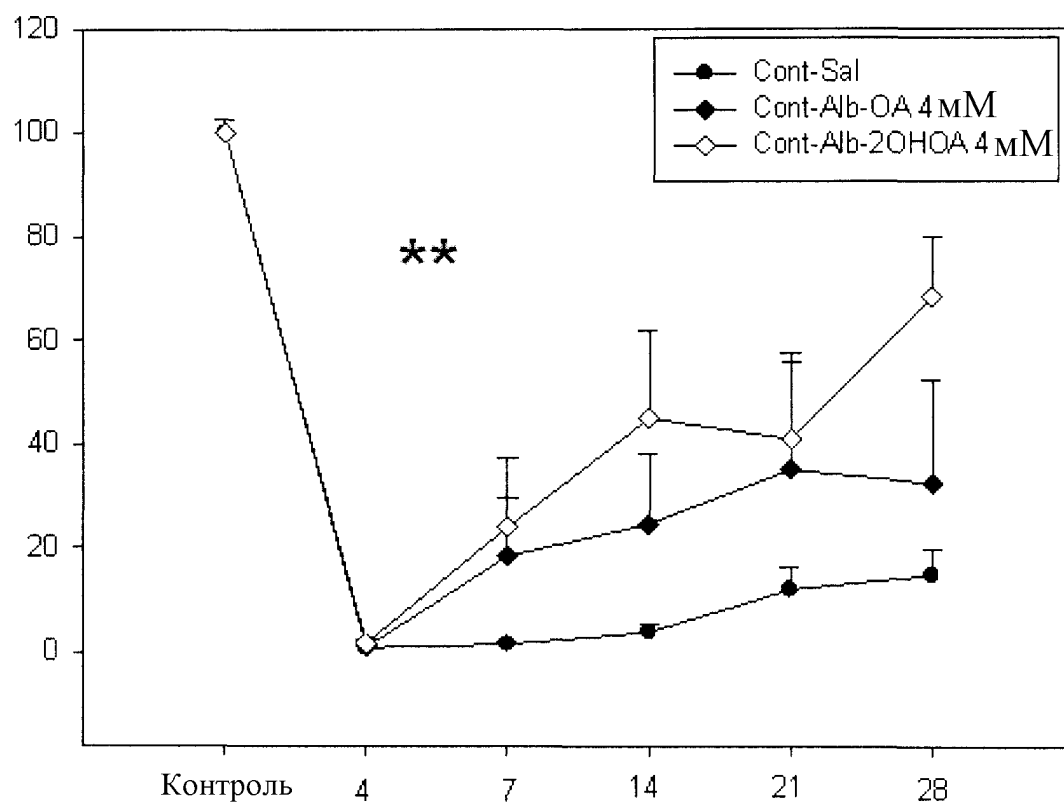
Фиг. 13



Фиг. 14



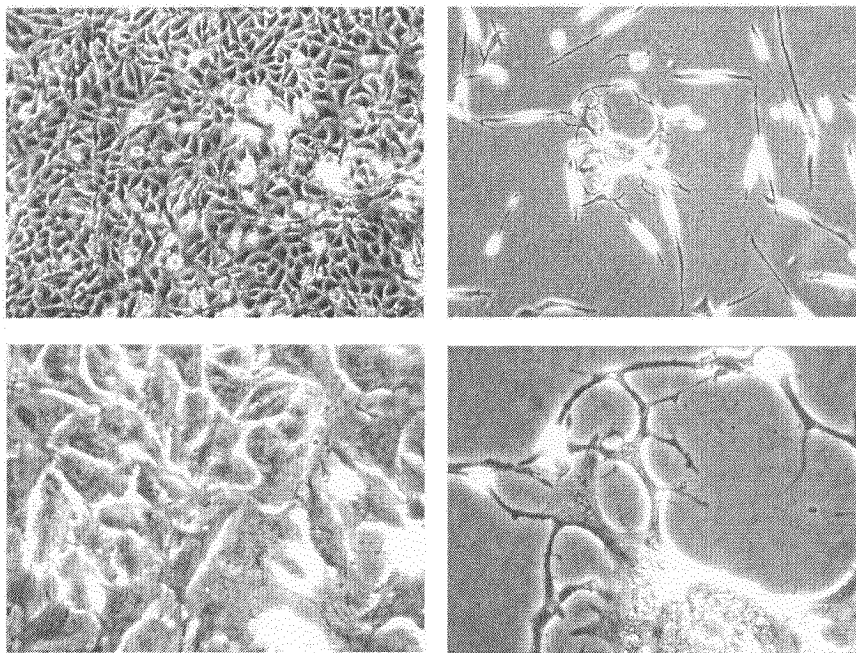
Фиг. 15



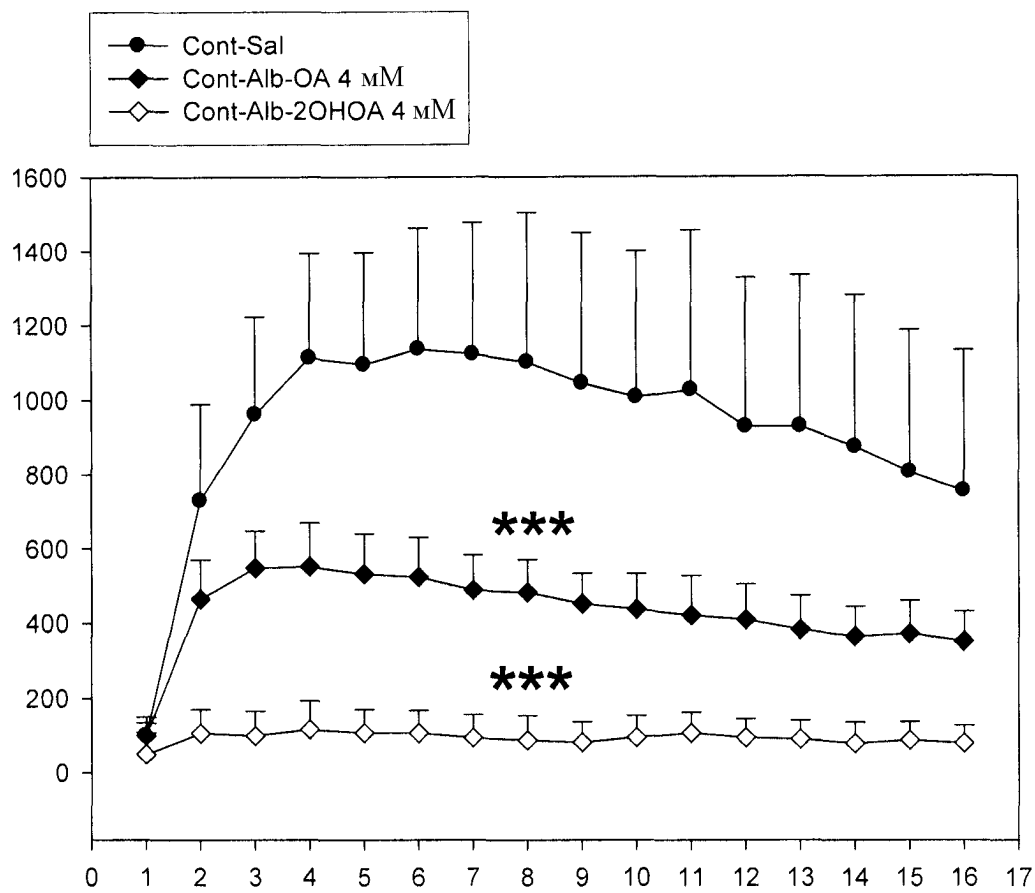
Фиг. 16А

Контроль

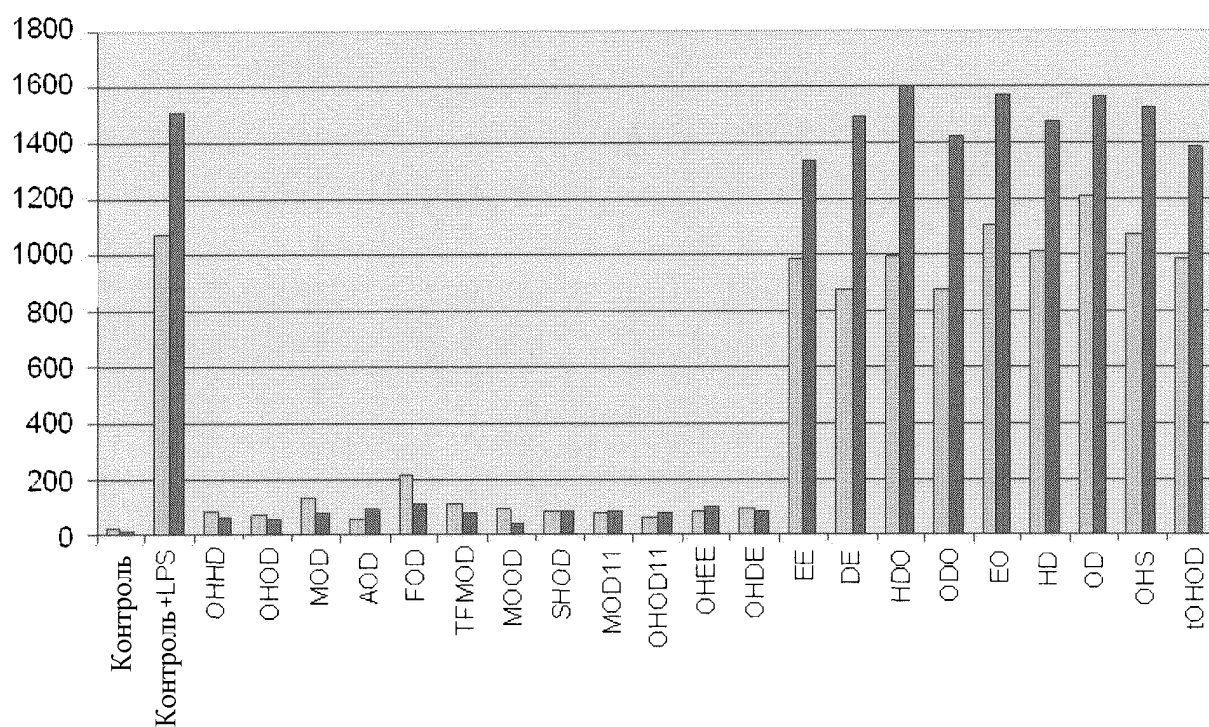
NaOHOD



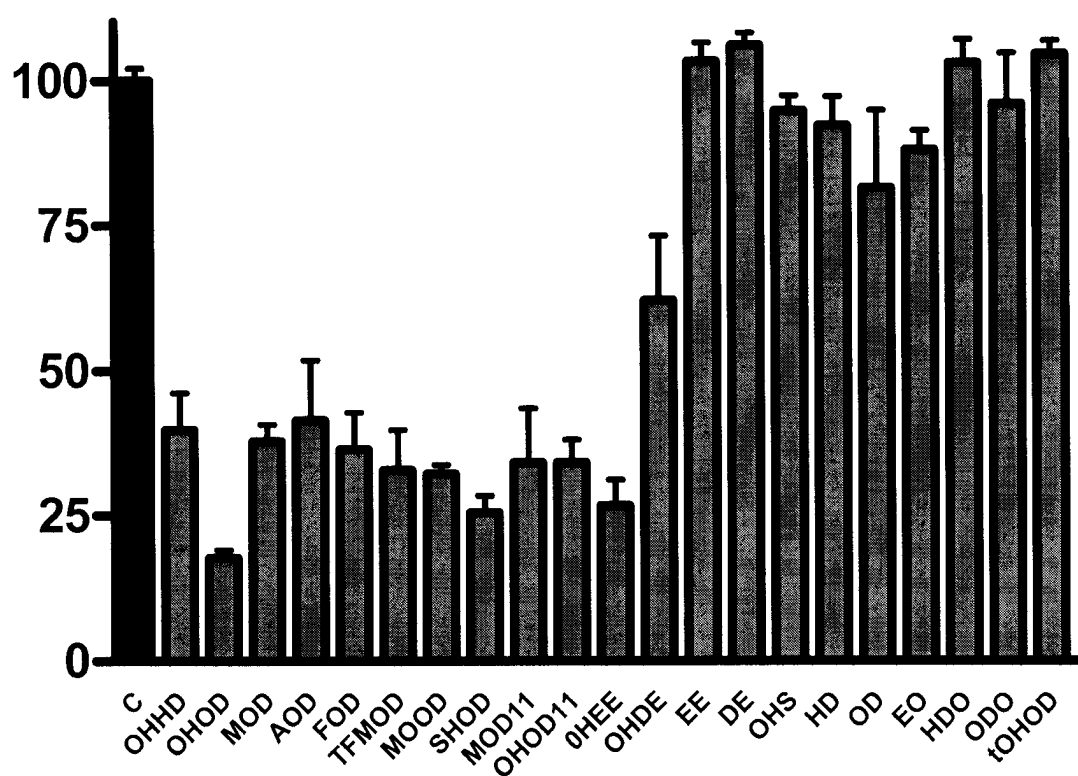
Фиг. 16В



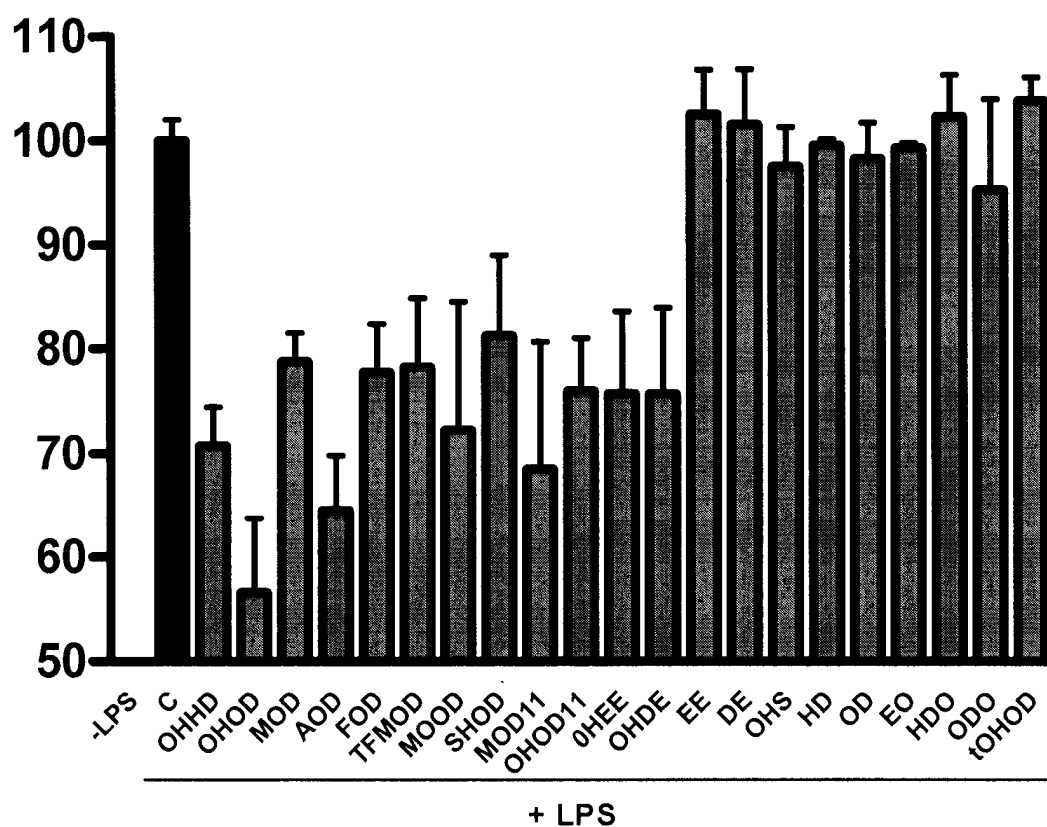
Фиг. 17



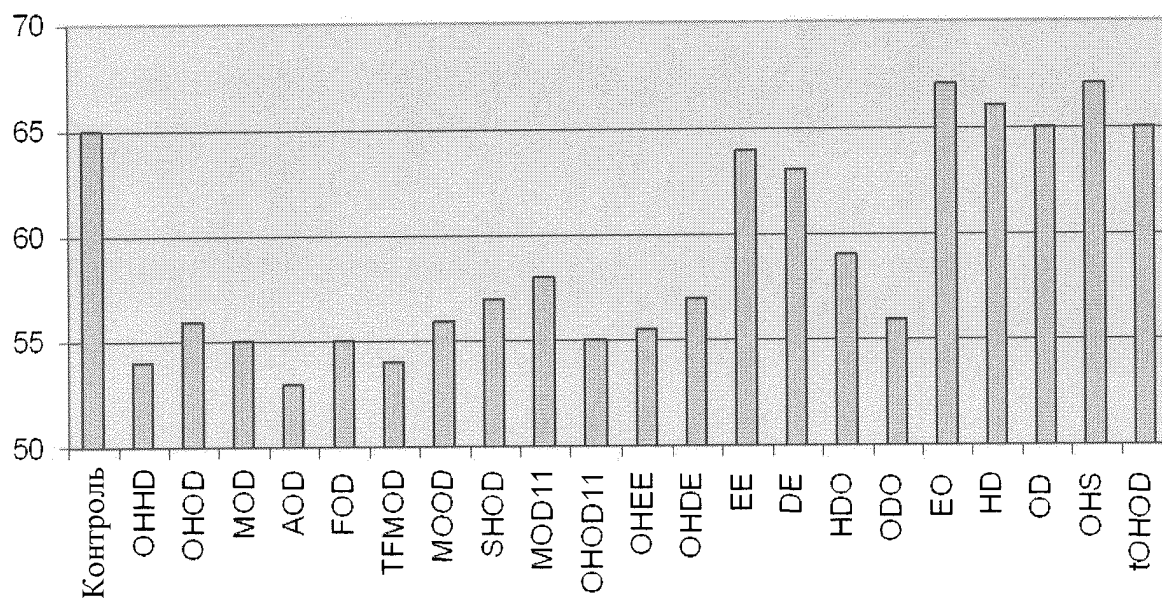
Фиг. 18



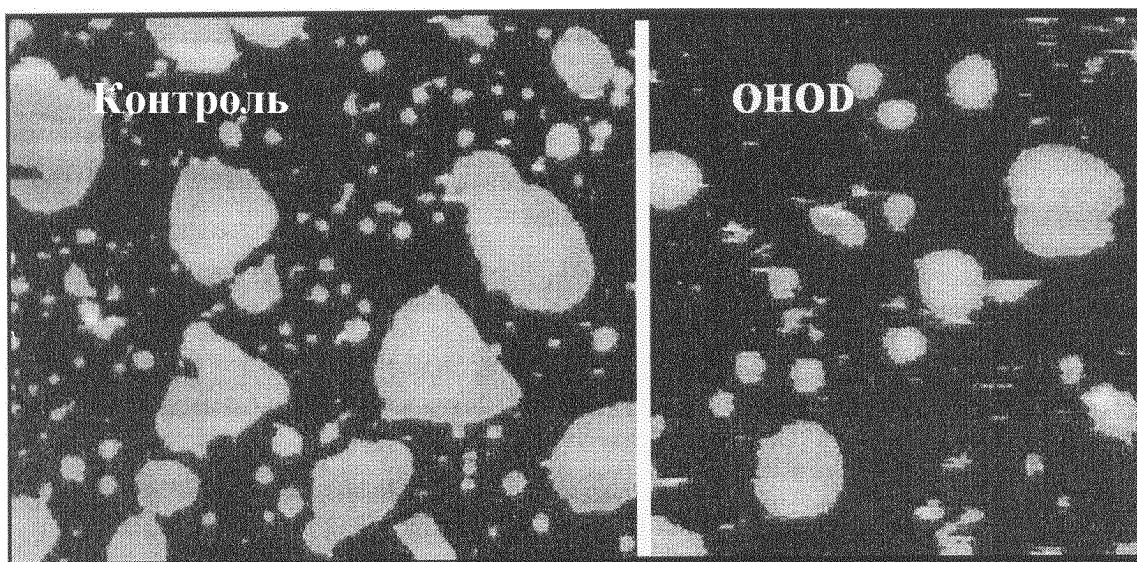
Фиг. 19А



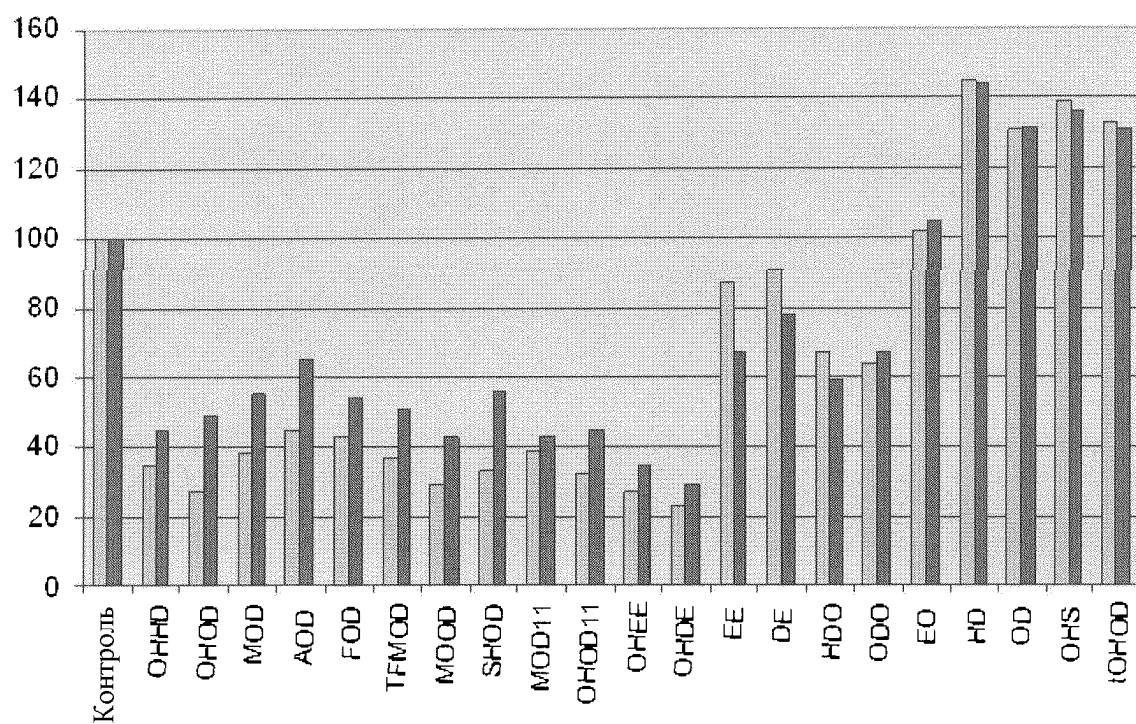
Фиг. 19В



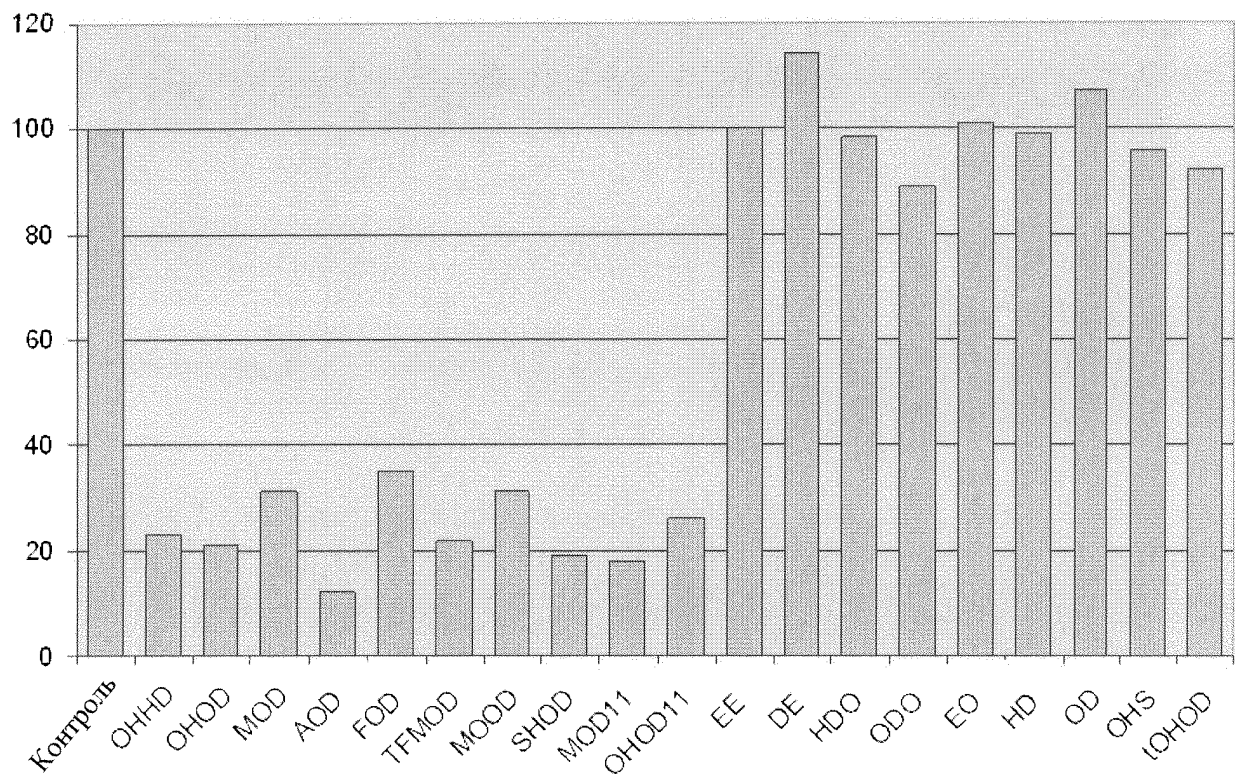
Фиг. 20



Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 22