

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038965**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.16**

**(51)** Int. Cl. *A61K 33/44* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201491690**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.03.15**

---

**(54) ЧАСТИЦЫ ПОРИСТОГО УГЛЕРОДА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ**

---

**(31)** 1204696.7

**(56)** WO-A1-2011070363  
EP-A1-1745793  
EP-A1-1525886  
WO-A2-0212380  
WO-A1-2012050025

**(32)** 2012.03.16

**(33)** GB

**(43)** 2015.02.27

**(86)** PCT/GB2013/050673

**(87)** WO 2013/136094 2013.09.19

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЮСЛ БИЗНЕС ПЛК (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хоуэлл Кэрол Анджела, Михаловский  
Сергей Викторович, Сэндман Сьюзан  
Рейчел, Джалан Раджив, Макнотен  
Джейн (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Осипов К.В., Рыбаков В.М., Хмара  
М.В., Липатова И.И., Новоселова  
С.В., Дощечкина В.В., Ильмер Е.Г.,  
Пантелеев А.С. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к применениям пористых углеродных частиц при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний печени или для модуляции функциональной оси "кишечник-печень", где от 20 до 90% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм, где указанные частицы приготовлены для перорального или ректального введения и где пористость измерена с помощью ртутной порометрии и/или газосорбционного анализа. Кроме того, изобретение относится к способам лечения или профилактики заболевания печени и модуляции функциональной оси "кишечник-печень" с использованием указанных пористых углеродных частиц, а также лекарственным формам, содержащим такие частицы.

---

**038965**  
**B1**

**038965**  
**B1**

### Область техники

Изобретение относится к лечению или профилактике заболеваний печени с помощью пористых углеродных частиц, содержащих микропоры диаметром 2 нм или менее и мезопоры/малые макропоры с диаметром от 30 до 500 нм, но, по существу, не имеющих мезопор диаметром более 2 нм и менее чем 30 нм, и, по существу, не имеющих больших макропор с диаметром более 500 нм. Также объектом изобретения является лечение или профилактика заболеваний печени с помощью пористых углеродных частиц, в которых по меньшей мере 20% от общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм. Настоящее изобретение также относится к способам лечения или профилактики заболеваний печени с использованием таких пористых углеродных частиц.

#### Предшествующий уровень техники

В одних только Соединенных Штатах, по оценкам, 60000 человек умирают каждый год от печеночной недостаточности, в то время как донорский фонд остается постоянным на уровне примерно 4000 со списком очередников 16000-18000 человек. Шансы получения донорской печени для субъектов, ожидающих ее по этому списку, равны только один к восьми, причем эффективное лечение или профилактика, способные продлить жизнь этой группе пациентов, пока отсутствуют.

Печеночная недостаточность приводит к множественной дисфункции органов, и смертность от нее составляет порядка 80%. Ключевую роль в патогенезе заболевания играют токсин бактериального происхождения и токсичные метаболиты, такие как ацетальдегид. Например, кишечная эндотоксемия и бактериальная транслокация играют центральную роль в патогенезе цирроза и его осложнений. Однако терапевтические возможности, направленные на борьбу с этими факторами, в настоящее время ограничены пролонгированными антибиотиками с сопутствующей им проблемой инфицирования резистентными организмами.

Перорально вводимые адсорбирующие пористые углеродные частицы в течение многих столетий применялись для лечения или профилактики различных заболеваний без значительных побочных эффектов. Активированные угли широко используются для лечения отравлений. Микропористый уголь, AST-120 (доступен для приобретения под торговым названием KREMEZIN® в фирме Kureha Corp, Japan) применяется для лечения пациентов с почечной недостаточностью. Однако клинические испытания по оценке эффективности AST-120 при лечении печеночной энцефалопатии показали отрицательный результат.

#### Краткое описание изобретения

Изобретение относится к лечению или профилактике заболеваний печени.

В соответствии с этим изобретение обеспечивает получение пористых углеродных частиц для применения при лечении или профилактике заболеваний печени, в которых от 20 до 90% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более остального общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм.

Изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания печени, включающему введение эффективного количества таких пористых углеродных частиц.

Изобретение также относится к применению таких пористых углеродных частиц при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний печени.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 - распределение пор для углей, полученных из фенольных смол, измеренное по адсорбции азота и определенное при помощи метода Баррета-Джойнера-Халенды (метода ВЖН) для неактивированных углей TE9, углей, активированных до 29% обгара, и углей, активированных до 47% обгара. Активация в первую очередь увеличивает поверхность микропор (диаметром < 2 нм). Малые макропоры (50-500 нм) остаются в значительной степени неизменными, не отмечается увеличение поверхности пор в диапазоне 2 - 50 нм (мезопоры);

фиг. 2 - репрезентативное распределение размера пор пористых углеродных частиц по настоящему изобретению, измеренное методом ртутной порометрии (А: испытуемый уголь TE7; В: испытуемый уголь TE8). Большой пик при диаметрах выше 30000 нм обусловлен пустым пространством между частицами угля, а не пористостью;

фиг. 3 - увеличение объема макропор (50-500 нм) с увеличением концентрации порообразователя от TE3 к TE7 для углей, активированных примерно до 50% обгара. Не обнаружено никакой значительной прибавки объема пор в диапазоне мезопор (2-50 нм) или какого-либо изменения объема пор в диапазоне микропор;

фиг. 4А - воздействие степени активации на структуру пор, определенное методом ртутной порометрии, эволюция объема пор, выраженная в см<sup>3</sup>/г и снижение объемной плотности, вызванное активацией; 4В - воздействие степени активации на структуру пор, определенное методом ртутной порометрии, изменение объема ртути в порах, выраженное в см<sup>3</sup>/см<sup>3</sup> в зависимости от степени активации;

фиг. 5А - удаление ацетальдегида с течением времени (пик ацетальдегида 500 мкм (22 мг/л), величина выборки n=3, среднее значение ± стандартная ошибка среднего (СОС), комнатная температура, 2-дифенилацетил-1,3-индандион-1-гидразон (ДИГ) как дериватизирующий агент, метод ВЭЖХ с детекци-

ей по рассеянию света); 5B - % адсорбции ацетальдегида на испытуемом угле в зависимости от времени (пик 7,2 мМ, 0,1 г/мл) (величина выборки n=3, среднее значение  $\pm$ СОС);

фиг. 6 - воздействие испытуемого угля ТЕ8 на рост бактерий, измеренное с помощью набора VasTite-Glo для анализа жизнеспособности микробной клетки путем оценки люминесцентного сигнала, возникающего после непосредственного контакта с E.coli, как функции времени (концентрация бактерий в посевном материале составляла  $3,9 \times 10^9$  в мл) (среднее значение  $\pm$ СОС, величина выборки n=3);

фиг. 7 - воздействие испытуемого угля ТЕ7 на рост бактерий, измеренное с помощью набора VasTite-Glo для анализа жизнеспособности микробной клетки путем оценки люминесцентного сигнала, возникающего после непосредственного контакта с S.aureus, как функции времени (концентрация бактерий в посевном материале составляла  $7,5 \times 10^7$  в мл) (среднее значение  $\pm$ СОС, величина выборки n=3). Данные свидетельствуют, что уголь не убивает эти бактерии ex-vivo;

фиг. 8 - воздействие фильтрата из испытуемого угля ТЕ7 на характеристики роста E.coli в зависимости от времени, измеренное путем увеличения мутности (540 нм) с использованием прибора для турбидиметрического анализа Biscreen (среднее значение, n=4). Данные свидетельствуют, что уголь не убивает эти бактерии ex-vivo;

фиг. 9 - воздействие фильтрата из испытуемого угля ТЕ7 на характеристики роста B.subtilis в зависимости от времени, измеренное путем увеличения мутности (540 нм) с использованием прибора для турбидиметрического анализа Biscreen (среднее значение, n=4). Данные свидетельствуют, что уголь не убивает эти бактерии ex-vivo;

фиг. 10А - удаление эндотоксина с помощью испытуемого угля в зависимости от времени по сравнению с контролем без угля (величина выборки n=3, среднее значение  $\pm$ СОС); 10В - удаление эндотоксина с помощью испытуемого угля в зависимости от времени по сравнению с контролем без угля; пик эндотоксина выше (0,1 г, максимальная концентрация в тканевой жидкости 200 МЕ/мл) (n=3);

фиг. 11 - способность испытуемого угля ТЕ8 к удалению фактора некроза опухолей (ФНО) из тканевой жидкости (ТЖ), выраженная в виде изотермы адсорбции, показывающей количество ФНО (мкг), адсорбированного на грамм угля по отношению к его равновесной концентрации (среднее значение, n=4);

фиг. 12 - биохимия печени - аланинаминотрансфераза (АЛТ). 12А - значительное снижение концентрации аланинтрансаминазы (АЛТ) наблюдали в группе животных с перевязкой желчного протока (ПЖП), получавших лечение углем и группе с ПЖП + введение липополисахарида внутривнутрибрюшинно по сравнению с нелеченными группами. Лечение углем было связано со снижением АЛТ от 99 ЕД/мл до 62 ЕД/мл у крыс из группы ПЖП + ЛПС (p=0,0152) и от 71 ЕД/мл до 52 ЕД/мл (p=0,0422) у крыс из группы ПЖП. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 13 - артериальная концентрация ФНО $\alpha$ . Концентрация ФНО $\alpha$  значительно снижается у группы ПЖП животных, получавших лечение углем;

фиг. 14 - портальное давление. Значительное снижение портального давления наблюдали в группе ПЖП + ЛПС (среднее значение 18,05 мм рт.ст. в группе нелеченных, 10,17 мм рт.ст. в группе, получавших лечение углем, p=0,0007) и группе ПЖП (среднее значение 12,57 мм рт.ст. в группе нелеченных, 11,02 мм рт.ст. в группе, получавших лечение углем, p=0,0043) после лечения углем. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 15 - масса тела. Значительное увеличение сухой конечной массы тела наблюдалось у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой (p=0,0271). Эти данные свидетельствуют о том, что введение угля может уменьшить кахексию, связанную с циррозом. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 16 - популяция клеток Купфера (CD163+). Лечение углем приводило к уменьшению популяции активных клеток Купфера у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные предоставляют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 17 - популяция активированных макрофагов (CD63+). Лечение углем приводит к уменьшению популяции активных клеток Купфера у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные предоставляют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на

желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 18 - общая активность активных форм кислорода (АФК) в печени. Лечение углем приводило к снижению окислительного стресса в печени у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные предоставляют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 19 - активность АФК в клетках Купфера. Лечение углем привело к снижению окислительного стресса в печени посредством модуляции производства активных форм кислорода в клетках Купфера у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные предоставляют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 20 - активность АФК в клетках Купфера в ЛПС группе. Лечение углем приводит к уменьшению индуцированной эндотоксином генерации активных форм кислорода в клетках Купфера у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные предоставляют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 21 - проницаемость кишечника. Проницаемость кишечника нормализовалась у ПЖП животных, получавших лечение углем по сравнению с нелеченной группой. Данные демонстрируют потенциальный механизм уменьшения поражения печени, наблюдаемого у ПЖП животных. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 22 - маркеры бактериальной транслокации (портальный венозный эндотоксин). Лечение углем заметно снижает эндотоксемию, повышенную кишечную проницаемость и бактериальную транслокацию;

фиг. 23 - отдаленное воздействие на органы (печеночная энцефалопатия). Лечение углем приводило к снижению содержания воды в мозговой ткани и уровня аммиака в сыворотке;

фиг. 24 - маркеры бактериальной транслокации (положительный ПЦР-результат на содержание бактерий). Лечение углем привело к заметному снижению бактериальной транслокации;

фиг. 25 - содержание цитокинов в воротной вене. При терапии углем наблюдали незначительное снижение содержания ИЛ-4 и ИЛ-10 в воротной вене;

фиг. 26 - гистология толстой кишки. Гистология подвздошной кишки, тощей кишки и толстой кишки, оставшаяся незатронутой после лечения углем, показывает, что лечение безопасно для слизистой оболочки кишечника. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 27 - сывороточный креатинин. Рост представляющего функцию почек сывороточного креатинина, уменьшившийся у ПЖП животных после введения ЛПС, удалось предотвратить у ПЖП животных, получавших лечение углем, что позволяет предположить уменьшение острого повреждения почек вследствие цирроза. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 28 - % содержание воды в тканях мозга. Повышенное содержание воды в мозге у ПЖП животных, получавших ЛПС, которое было предотвращено у животных, получавших лечение углем, позволяет предположить, что лечение ПЖП животных снижает мозговые осложнения цирроза печени и, следовательно, печеночную энцефалопатию. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ЛПС: животным вводили липополисахарид внутривнутрибрюшинно; ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 29 - бактериоиды/общее содержание бактерий в стуле. Данные свидетельствуют о том, что содержание видов бактериоидов увеличивается в стуле ПЖП животных, но сводится к нормальному уровню у ПЖП животных, получавших лечение углем, однако общее число бактерий остается тем же самым. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 30 - фирмикуты/общее содержание бактерий в стуле. Данные свидетельствуют о том, что содержание видов фирмикутов увеличивается в стуле ПЖП животных, но сводится к нормальному уровню у ПЖП животных, получавших лечение углем, однако общее число бактерий остается тем же самым. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 31 - соотношение фирмикуты/бактероиды в стуле. Данные свидетельствуют о том, что соотношение видов фирмикутов к бактероидам уменьшается в стуле ПЖП животных, но сводится к нормальному уровню у ПЖП животных, получавших лечение углем. (Ложнооперированные: крысы, подвергнутые имитации операции на желчевыводящих путях, ПЖП: перевязка желчного протока [наблюдение спустя 4 недели после нее], ПЖП-уголь относится к группе животных, получавших лечение углем);

фиг. 32 - масса. Лептин-дефицитные Ob/Ob мыши с ожирением теряют массу при лечении углем, приближаясь к нормальному уровню. Эти данные свидетельствуют о том, что уголь может быть полезен для лечения ожирения. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 33 - АЛТ. Лечение углем мышей с ожирением (Ob/Ob) приводит к снижению повреждения печени, говорящему о том, что уголь может быть средством лечения неалкогольной жировой болезни печени. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 34 - гистология печени. Лечение углем мышей с ожирением приводит к снижению накопления жира в печени и уменьшению воспалительной клеточной инфильтрации. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 35 - популяция клеток Купфера (F4/80<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>). Лечение углем мышей с ожирением приводит к снижению активации клеток Купфера. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 36 - популяция клеток Купфера (F4/80<sup>+</sup>). Лечение углем мышей с ожирением приводит к снижению активации клеток Купфера. Это дает возможный механизм, с помощью которого уменьшается повреждение печени у Ob/Ob мышей, получавших лечение углем. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 37 - популяция клеток Купфера (F4/80<sup>+</sup>) + ЛПС. Продукция АФК. Лечение углем мышей с ожирением приводит к уменьшению производства активных форм кислорода клетками Купфера. (Ob<sup>-</sup>: гетерозиготы по ob гену; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup>: гомозиготы по Ob/Ob гену; +С: группы, получавшие лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 38 - гистология печени (окрашивание коллагена). В модели неалкогольной жировой болезни печени с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (частичная метионин-холин-дефицитная диета, ЧМХДД), уголь уменьшает гистологические проявления фиброза; это свидетельствует о том, что применение угля может быть средством для лечения фиброза печени (ЧМХДД нелеченные: только диета; ЧМХДД-уголь: диета + лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 39 - печень; экспрессия генов для маркеров фиброза. В модели неалкогольной жировой болезни печени с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД), уголь снижает экспрессию генов коллагена A2 и TGFB1. Эти данные свидетельствуют, что уголь может быть средством для профилактики фиброза печени (ЧМХДД нелеченные: только диета; ЧМХДД-С4: диета + лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 40 - АЛТ. В модели неалкогольной жировой болезни печени с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД), назначение угля уменьшает повреждения печени; это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения неалкогольного ожирения печени. (ЧМХДД нелеченные: только диета; ЧМХДД-С: диета + лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 41 - гистология печени (окрашивание гематоксилином и эозином, Г&Э). В модели неалкогольной жировой болезни печени с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД), уголь снижает накопление жира в печени; это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения неалкогольной жировой болезни печени. (ЧМХДД нелеченные: только диета; ЧМХДД-С: диета + лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 42 - гистология печени (оценка степени стеатоза). В модели неалкогольной жировой болезни печени с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД), уголь снижает накопление жира в печени; это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения неалкогольной жировой болезни печени. (ЧМХДД нелеченные: только диета; ЧМХДД-С: диета + лечение углем в течение 4 недель);

фиг. 43 - биохимия печени. В модели неалкогольной жировой болезни печени с метионин-холин-дефицитной диетой (МХДД) уголь уменьшает повреждение печени; это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения неалкогольной жировой болезни печени. (НЛ: группа, не получавшая лечения; НЛ+С: группа, не получавшая лечения + лечение углем; МХДД: только диета; МХДД+С: животные с МХДД, получавшие лечение углем);

фиг. 44 - гистология печени (окрашивание Г&Э). В модели неалкогольной жировой болезни печени с метионин-холин-дефицитной диетой (МХДД) уголь снижает накопление жира, это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения неалкогольной жировой болезни печени. (МХДД не-леченные: только диета; МХДД+уголь: животные с МХДД, получавшие лечение углем);

фиг. 45 - в модели неалкогольной жировой болезни печени с метионин-холин-дефицитной диетой (МХДД) уголь уменьшает гистологические проявления фиброза, это свидетельствует о том, что уголь может быть средством для лечения фиброза печени. (МХДД не-леченные: только диета; МХДД+уголь: животные с МХДД, получавшие лечение углем).

#### **Подробное описание изобретения**

В описании, слово "содержать", или такие его вариации, как "состоящий" или "включающий", следует понимать как включение указанного элемента, целого или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение при этом любого другого элемента, целого или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий.

Используемый в данном описании термин "частица угля с контролируемой пористостью" эквивалентен термину "пористая углеродная частица".

В значении, используемом в данном изобретении, термин "микропора" относится к порам с диаметром 2 нм или менее, при измерении методом адсорбции азота и методом ртутной порометрии, как определено IUPAC.

В значении, используемом в данном изобретении, термин "мезопора" относится к порам с диаметром более чем 2 нм и менее чем 50 нм при измерении методом адсорбции азота и методом ртутной порометрии и, как определено IUPAC.

В значении, используемом в данном изобретении, термин "макропора" относится к порам с диаметром 50 нм или более при измерении методом адсорбции азота и методом ртутной порометрии и как определено IUPAC.

Ссылка на любой предшествующий уровень техники в данной спецификации не является и не должна рассматриваться как подтверждение или указание в любой другой форме на то, что этот уровень техники является частью общих знаний в Австралии или в другом месте.

В настоящее время ассортимент лечения или профилактики, доступный для пациентов с заболеваниями печени, ограничен. Для многих пациентов единственным вариантом является пересадка печени, но эффективное лечение или профилактика, способные продлить срок жизни этой группе пациентов, все еще отсутствуют. Таким образом, существует необходимость в поиске лечения или режима профилактики, которые могут быть использованы для улучшения состояния людей, страдающих от болезни печени.

Эндотоксемия кишечного происхождения занимает центральное место в патогенезе хронических заболеваний печени и возникает как следствие бактериальной транслокации. Эндотоксемия участвует в патогенезе ранней и конечной стадии цирроза, играет ключевую роль в патогенезе обострения хронической печеночной недостаточности, связанной с полиорганной недостаточностью и высокой смертностью. Как полагают, этот эффект опосредуется нарушением регуляции воспалительной реакции.

Эндотоксемия также участвует в патогенезе других заболеваний печени, таких как алкогольная болезнь печени (АБП) и неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), а также в патогенезе спонтанного бактериального перитонита, гепаторенального синдрома, варикозного кровотечения, синдрома гипердинамической циркуляции и печеночной энцефалопатии. Множество доказательств причастности эндотоксина к иммунной дисфункции коррелировали с увеличением частоты случаев сепсиса в клинике. Патогенез алкогольной болезни печени (АБП) напрямую связан с метаболизмом этанола кишечными бактериями и продукцией ацетальдегида. Ацетальдегид вызывает нарушение нормальной функции кишечного барьера, ведущее к бактериальной транслокации в портальный кровоток и освобождению системного эндотоксина в результате воспаления и травмы печени. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) связана с бактериальной транслокацией и эндогенным производством этанола внутрипросветными бактериями. Поэтому в данном контексте ацетальдегид также может играть важную роль в повреждении слизистой.

Как было отмечено выше, бактериальная транслокация, эндотоксемия и связанная с ними иммунная/воспалительная реакция причастны к прогрессированию АБП, НАЖБП и развитию осложнений цирроза. Анатомическая и функциональная целостность кишечного барьера является ключевым фактором, определяющим скорость бактериальной транслокации и, таким образом, эндотоксемию. Связывание токсина бактериального происхождения, токсических метаболитов и локальных цитокинов должно, в принципе, уменьшать повреждения слизистой оболочки и эндотоксемию. Результатом этого должно быть уменьшение поражения печени, замедление прогрессирования заболевания и улучшение функции нейтрофилов. Часто применяющейся стратегией для уменьшения портальной эндотоксемии является селективная деконтаминация кишечника с помощью пероральных антибиотиков. Она представляет собой хорошую краткосрочную стратегию, сопровождающуюся уменьшением осложнений, связанных с дисфункцией печени, включая печеночную энцефалопатию, портальную гипертензию, гепаторенальный синдром и бактериальный перитонит. Однако данные, демонстрирующие увеличение устойчивости к антибиотикам и возникновение суперинфекций, ограничивают роль антибиотиков.

Авторы настоящего изобретения исследовали способность пористых углеродных частиц, имеющих контролируемую пористость, адсорбировать биологические молекулы и применение этих частиц для лечения или профилактики заболеваний печени, обеспечивая тем самым альтернативную стратегию по отношению к лечению с использованием обычных антибиотиков.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к пористым углеродным частицам для применения при лечении или профилактике заболеваний печени, причем, данные частицы содержат мезопоры диаметром 2-50 нм и малые макропоры с диаметром 50 нм и выше. В еще одной форме осуществления настоящего изобретения пористые углеродные частицы по настоящему изобретению содержат микропоры диаметром 2 нм или менее, и мезопоры/малые макропоры с диаметром от 30 до 500 нм, но, по существу, не содержат мезопор диаметром более 2 нм и менее чем 30 нм и, по существу, не содержат больших макропор диаметром более 500 нм.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что такие нерассасывающиеся пористые углеродные частицы, имеющие регулируемую пористость для того, чтобы обеспечить относительно высокую долю пор в диапазоне мезо-макропор, или в диапазонах микро- и малых макропор, являются подходящими адсорбентами патогенных медиаторов, обсуждавшихся выше, и способны модулировать функцию печеночных клеток Купфера, которые продуцируют вредные свободные радикалы, возможно, через снижение транслокации лигандов толл-подобных рецепторов. Пористые углеродные частицы являются нерассасывающимися и, следовательно, опосредуют свое действие локально на поверхности кишечного барьера. Однако в отличие от обычных неадсорбирующихся антибиотиков пористые углеродные частицы по настоящему изобретению, как было показано, не влияют отрицательно на рост бактерий, которые важны для поддержания экологии кишечника.

Получаемый обычным путем активированный уголь (например, гранулированный активированный уголь), как правило, является микропористым, имеющим поры диаметром менее 2 нм (определение IUPAC), с небольшим объемом пор в диапазонах мезопор (2-50 нм) или макропор (более чем 50 нм) или практически не содержащим пор в этих диапазонах.

Пористые углеродные частицы для применения по настоящему изобретению могут иметь от 20 до 90% общего объема пор, выполненного порами, имеющими средний диаметр 2 нм или меньше (микропор), и 75% или более оставшегося общего объема пор (т.е. объема пор, который составляют поры, имеющие средний диаметр более, чем 2 нм), выполненного порами, имеющими средний диаметр от 30 до 500 нм (мезопоры/малые макропоры).

Таким образом, пористые углеродные частицы могут иметь бимодальное распределение размеров пор, в результате чего общий объем пор распределяется между диапазонами микропор и крупных мезопор/малых макропор, и, по существу, не содержит мезопор диаметром менее 30 нм или больших макропор. Наличие крупных макропор предпочтительно свести к минимуму, поскольку поры со средним диаметром выше 500 нм снижают физическую прочность частиц и обеспечивают малую или практически не улучшаемую адсорбцию.

Как правило, мезопоры диаметром менее 30 нм составляют 20% от общего объема пор или менее, более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее. Как правило, большие макропоры составляют 20% от общего объема пор или менее, более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее. Как правило, мезопоры диаметром менее 30 нм и большие макропоры вместе составляют 20% от общего объема пор или менее, предпочтительно 15% или менее, более предпочтительно 10% или менее.

Как правило, от 25 до 70%, предпочтительно от 35 до 60%, более предпочтительно от 45 до 55% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее.

Как правило, 80% или более, предпочтительно 85% или более, более предпочтительно 90% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм, предпочтительно от 30 до 300 нм, более предпочтительно от 50 до 200 нм.

Как правило, общий объем пор, измеренный по адсорбции азота составляет от 0,5 до 2,5 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно от 1,0 до 2,0 см<sup>3</sup>/г, более предпочтительно от 1,2 до 1,8 см<sup>3</sup>/г. В одной форме осуществления настоящего изобретения общий объем пор, измеренный по адсорбции азота, составляет 1,3 до 1,8 см<sup>3</sup>/г. В одной форме осуществления настоящего изобретения общий объем пор, измеренный по адсорбции азота, составляет 1,3 до 1,4 см<sup>3</sup>/г.

Как правило, объем пор, относящийся к микропорам, имеющим средний диаметр 2 нм или менее, равен 0,2 см<sup>3</sup>/г или более, предпочтительно от 0,2 до 0,5 см<sup>3</sup>/г, более предпочтительно от 0,3 до 0,4 см<sup>3</sup>/г.

Как правило, объемная плотность пористых углеродных частиц составляет 0,10 г/см<sup>3</sup> или более, предпочтительно 0,15 г/см<sup>3</sup> или более, еще предпочтительнее 0,20 г/см<sup>3</sup> или более. Результатом того, что частицы имеют более высокую объемную плотность, является уменьшенный общий объем углеродных частиц, необходимый для перорального введения, что полезно, например, для выполнения пациентом предписаний врача. В одной форме осуществления настоящего изобретения объемная плотность пористых углеродных частиц составляет от 0,10 до 0,30 г/см<sup>3</sup>, предпочтительно от 0,15 до 0,25 г/см<sup>3</sup>, более предпочтительно от 0,18 до 0,22 г/см<sup>3</sup>.

В отличие от этого, в одной форме осуществления изобретения у пористых углеродных частиц по

меньшей мере 20% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм.

Предпочтительно чтобы по меньшей мере 20% общего объема пор в пористых углеродных частицах состояло из пор, имеющих средний диаметр от 20 до 200 нм, предпочтительно от 30 до 200 нм, предпочтительно от 30 до 150 нм, более предпочтительно от 50 до 120 нм или от 60 до 100 нм. Вклад пор этого размера составляет от общего объема пор предпочтительно более 25%, еще предпочтительнее более чем 30%. Соответственно, поры вышеуказанных размеров составляют от 25 до 75% общего объема пор, предпочтительно от 30 до 60%, предпочтительно от 30 до 50%, более предпочтительно от 30 до 40% общего объема пор.

Пористые углеродные частицы для применения по настоящему изобретению могут также включать микропоры, имеющие средний диаметр от 0,6 до 2 нм. Вклад таких микропор по отношению к общему объему пор может составлять до 50%, например от 5 до 30%.

Пористые углеродные частицы могут также включать большие макропоры, имеющие диаметр более чем 200 нм, например более 500 нм. Вклад таких макропор, имеющих диаметр более чем 200 нм, по отношению к общему объему пор может составлять до 74%, например от 25 до 70%.

Предпочтительно, чтобы общий объем пор, имеющих средний диаметр от 30 до 150 нм, составлял от 0,2 до 2,0 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно от 0,5 до 1,5 см<sup>3</sup>/г.

Когда частицы дополнительно содержат микропоры, общий объем микропор, имеющих средний диаметр от 0,6 до 2 нм, составляет предпочтительно от 0,01 до 1,5 см<sup>3</sup>/г.

Когда частицы дополнительно содержат большие макропоры, общий объем макропор, имеющих средний диаметр больше чем 200 нм, составляет предпочтительно от 0,2 до 2,0 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно от 0,2 до 1,0 см<sup>3</sup>/г.

В одной наиболее предпочтительной форме осуществления настоящего изобретения пористые углеродные частицы для применения по настоящему изобретению имеют свойства, изложенные ниже.

Размер макропор составляет 0,5-2 нм.

Площадь поверхности по методу БЭТ составляет от 700 до 2000, предпочтительно 1000-1500 м<sup>2</sup>/г.

Объем микропор пор составляет от 0,1 до 1,1 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно от 0,3 до 1,0 см<sup>3</sup>/г.

Размер мезопор/макропор малого размера составляет 30-500 нм, предпочтительно 50-300 нм.

Объем мезопор/макропор малого размера составляет от 0,8 до 2,5 см<sup>3</sup>/г.

Общий объем пор составляет от 0,9 до 3,5 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно от 1,1 до 2,0 см<sup>3</sup>/г.

Доля микропор (% от объема) составляет от 27 до 29%.

В одной форме осуществления настоящего изобретения в пористых углеродных частицах для применения по настоящему изобретению по меньшей мере 20% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 20 до 200 нм и от 20 до 90% от общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а менее чем 75% оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм.

В одной форме осуществления настоящего изобретения в пористых углеродных частицах для применения по настоящему изобретению по меньшей мере от 20 до 90% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм, но по меньшей мере 80% от общего объема пор составляют поры, которые не имеют средний диаметр от 20 до 200 нм.

Пористость угля может быть измерена с помощью ртутной порометрии (например, с использованием автоматического ртутного интрузионного порозиметра, такого как автоматический ртутный интрузионный порозиметр PoreMaster® (Quantachrome Instruments)) и/или газосорбционного анализатора (например, с использованием газо-адсорбционного анализатора Autosorb (Quantachrome Instruments)).

Метод ртутной порометрии измеряет поры более чем 2 нм, в частности более чем 20 нм, а газосорбционный анализ используется для измерения микропор и мезопор и в целом обеспечивает эффективные измерения пористости для пор, имеющих средний диаметр от 0,5 до 50 нм, поэтому использование обоих методов может являться неизбежным, особенно для измерения частиц, имеющие бимодальную пористость, как описано выше. Результаты выше 50 нм, полученные по методу адсорбции азота, не могут соответствовать данным, полученным с помощью метода ртутной порометрии. В случае несоответствия результатов для пор со средним диаметром более 50 нм следует использовать результаты, полученные методом ртутной порометрии.

Фиг. 2 показывает измерения объема пор наиболее крупных малых макропор в частицах по настоящему изобретению так, как это предусмотрено методом ртутной порометрии. Микропоры не видны на фиг. 2, потому что метод ртутной порометрии измеряет поры больше чем 2 нм. Фиг. 1 показывает эволюцию объема азота в порах <2 нм и порах с размерами в диапазоне 50-500 нм для угля TE7 как функцию от обгара (степень активации).

Изменение объема ртути в порах в зависимости от активации показано на фиг. 4. Когда объем ртути в порах измеряется в единицах см<sup>3</sup>/г, то имеется явное значительное увеличение объема пор в зависимости активации. Однако это отражает, прежде всего, уменьшение плотности в зависимости активации. При использовании объема, который лучше всего отражает изменения структуры, объем малых макропор остается постоянным для всех уровней активации, т.е. при активации увеличивается только объем



микропор.

Результаты, полученные методом ртутной порометрии, могут отражать данные для пор с большим диаметром, которые соответствуют пустотам между пористыми углеродными частицами, и не отражают размер пор внутри углеродных частиц. Следовательно, будет существовать эффективный объем макропор эквивалентный ~35% объема микросфер, относящийся к пустотам, причем размер этих пустот составляет ~20% от размера микросферы. Таким образом, результатами ртутной порометрии, составляющими 15% размера микросфер или более, например 20% размера микросфер или более, можно пренебречь при рассмотрении пористости. Например, углеродные частицы размером 250-500 мкм могут иметь размер пустот между частицами, отраженный в данных об объеме ртути, равный около 50-100 мкм.

Как правило, объем больших мезопор/малых макропор по отношению к массе, определенной методом ртутной порометрии, составляет 0,60 см<sup>3</sup>/г, предпочтительно выше чем 1,1 см<sup>3</sup>/г и, более предпочтительно, выше чем 1,5 см<sup>3</sup>/г.

Методика газосорбционного анализа, которая используется для измерения микропор, представляет собой, как правило, анализ при помощи адсорбции азота.

Количество микропор в углях может быть увеличено путем активации, а изменение площади поверхности и объема пор при активации показано в табл. 2. Предпочтительно, чтобы пористые углеродные частицы имели удельную площадь поверхности, измеренную с помощью метода БЭТ (метод Брунауэра-Эммета-Теллера), равную по меньшей мере 700 м<sup>2</sup>/г. Удельная площадь поверхности может превышать 900 м<sup>2</sup>/г; как правило, превышает 1000 м<sup>2</sup>/г. В одной форме осуществления настоящего изобретения удельная площадь поверхности составляет более 1200 м<sup>2</sup>/г. Подходящие размеры удельной площади поверхности находятся в диапазоне от 1000 до 2500 м<sup>2</sup>/г, предпочтительно от 1400 до 2000 м<sup>2</sup>/г. В одной форме осуществления настоящего изобретения удельная площадь поверхности составляет от 700 до 2000 м<sup>2</sup>/г, как правило от 900 до 1400 м<sup>2</sup>/г, предпочтительно от 1000 до 1200 м<sup>2</sup>/г. В другой форме осуществления настоящего изобретения удельная площадь поверхности составляет 1200 м<sup>2</sup>/г или менее, например от 700 до 1200, от 900 до 1200 м<sup>2</sup>/г или от 1000 до 1200 м<sup>2</sup>/г.

Предпочтительно, чтобы пористые углеродные частицы имели средний диаметр от 2 до 2000 мкм, например от 50 до 2000 мкм, от 200 до 1600 мкм или от 100 до 1000 мкм. Таким образом, подходящие частицы могут иметь средний диаметр, например, от 200 до 600 мкм, предпочтительно от 250 до 500 мкм. Другие подходящие частицы могут иметь средний диаметр от 1000 до 2000 мкм, предпочтительно от 1000 до 1500 мкм. Однако предпочтительными являются частицы, имеющие средний диаметр 1000 мкм или менее. Размер частиц может быть измерен с помощью метода лазерной дифракции (например, с помощью анализатора размеров частиц Malvern (Malvern Instruments)).

Предпочтительно, чтобы пористые углеродные частицы представляли собой по форме сферические частицы.

В одной форме осуществления настоящего изобретения пористые углеродные частицы могут быть поверхностно модифицированы для того, чтобы изменить их адсорбционную емкость по отношению к биологическим молекулам.

Пористые углеродные частицы могут быть в виде непокрытых частиц. Для таких непокрытых пористых углеродных частиц доказана биосовместимость. Альтернативно, частицы могут быть покрыты для того, чтобы контролировать высвобождение из них и их адсорбционные свойства. Например, частицы могут быть покрыты пленкой, которая делает возможным преобладающее высвобождение в толстой кишке.

Пористые углеродные частицы для применения по настоящему изобретению могут быть получены любым подходящим способом. Подходящие способы описаны, например, в патенте WO 02/12380.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболеваний печени, включающему введение эффективного количества пористых углеродных частиц, в которых по меньшей мере 20% от общего объема пор в них составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм; а также к использованию пористых углеродных частиц, в которых по меньшей мере 20% от общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм, при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний печени, причем пористые углеродные частицы представляют собой, предпочтительно, такие частицы, как описано выше.

Приготовление сферических углеродных микросфер с бимодальной пористостью, полученных из фенольной смолы.

В связи с настоящим изобретением существуют два типа макропор. В макропористых микросферах они расположены внутри микросферы и образуются с помощью порообразователей. Их размер, как правило, составляет 30-500 нм, предпочтительно 50-300 нм.

Как правило, используется композиция смолы предшественника, которая содержит значительную долю порообразователя, например 250 частей этиленгликоля или другого порообразователя на 100 частей компонентов, образующих смолу, хотя высокая пористость может быть также достигнута за счет использования таких добавок, как мочевины в сочетании с этиленгликолем.

Патент US 2008025907 A1 (Tennison et al.; содержание которого включено в настоящее описание путем ссылки) описывает изготовление мезопористой смолы при помощи конденсации нуклеофильного

компонента, содержащего фенольное соединение, или фенольной конденсации преполимера по меньшей мере с одним электрофильным сшивающим агентом, выбранным из формальдегида, параформальдегида, фурфурола и гексаметилентетрамина в присутствии порообразователя, выбранного из группы, состоящей из диола (например, этиленгликоля), простого эфира диола, циклического сложного эфира, замещенного циклического сложного эфира, замещенного линейного амида, замещенного циклического амида, аминок спирта, и смешивания любых соединений из указанных выше, с водой с образованием смолы. Порообразователь присутствует в количестве, эффективном для придания смоле макропористости (например по меньшей мере 150 мас.ч. порообразователя используется для растворения 100 мас.ч. суммы компонентов, образующих смолу, т.е. нуклеофильного компонента плюс электрофильного компонента), причем он удаляется из пористой смолы после конденсации путем каскадной промывки водой или вакуумной сушки.

Полученная смола может быть подвергнута обжигу при нагревании в инертной атмосфере до температуры по меньшей мере 600°C для того, чтобы получить материал, имеющий бимодальное распределение пор, пористую структуру, которая при оценке методом адсорбции азота содержит микропоры и мезопоры или макропоры. Значение дифференциала объема пор по отношению к логарифму радиуса пор ( $dV/d\log R$ ) для мезопор выше, чем 0,2, по меньшей мере, для некоторых значений размеров пор в диапазоне 20-500 Å. Мезопористый уголь может иметь площадь поверхности по методу БЭТ, равную 250-700 м<sup>2</sup>/г без активации. Он может быть активирован путем нагревания его при высокой температуре в присутствии диоксида углерода, водяного пара или их смеси, например, путем нагревания его в присутствии диоксида углерода при температуре выше 800°C. После этого он может иметь площадь поверхности до 2000 м<sup>2</sup>/г и даже еще выше, например 1000-2000 м<sup>2</sup>/г. Используемый здесь термин "площадь поверхности по методу БЭТ" определен Брунауэром, Эмметом и Теллером (БЭТ) в соответствии с ASTM D1993-91, см. также ASTM D6556-04.

Для целей настоящего изобретения является предпочтительным использовать диоксид углерода.

Нуклеофильный компонент фенольных смол.

Смолы для изготовления углеродного материала могут быть получены из любых исходных материалов, описанных в патенте US 2008025907 A1. Нуклеофильные компоненты могут содержать фенол, бисфенол А, алкилфенолы, например крезол, дифенолы, например резорцин и гидрохинон и аминок фенолы, например м-аминофенол.

Предпочтительно использовать в качестве нуклеофильного компонента фенольный новолак или другой похожий олигомерный исходный материал, который, поскольку он уже частично полимеризован, делает полимеризацию до нужной смолы менее экзотермической, и, следовательно, более управляемой реакцией. Предпочтительные новолаки имеют среднюю молекулярную массу (СММ) в диапазоне от 300 до 3000 до сшивания (соответствующую степени полимеризации по отношению к фенолу около 3-30). Использующиеся новолачные смолы могут быть твердыми веществами с температурой плавления в области 100°C. Новолачные смолы с молекулярной массой менее 2000, предпочтительно менее 1500, образуют сшитые смолы, которые при обжиге имеют тенденцию образовывать уголь с заданным распределением размеров пор при использовании меньших количеств порообразователя. Новолаки термически стабильны в том, что они могут быть нагреты до расплавления и охлаждены так, чтобы они повторно затвердели без структурных изменений. Они сшиваются путем добавления сшивающих агентов и нагрева. Полностью сшитые смолы являются неплавкими и нерастворимыми.

Поскольку коммерческие новолаки в основном получают с использованием фенола и формальдегида, то можно использовать разнообразные модификации реагентов на стадии формирования преполимера для того, чтобы ввести ряд различных функциональных кислородо- и азотсодержащих групп и сайтов для образования поперечной связи. Они включают, без ограничений:

(а) двухатомные фенолы, например резорцин и гидрохинон. Оба являются более реакционноспособными, чем фенол и могут привести к некоторому сшиванию на стадии производства преполимера. Кроме того, можно ввести эти соединения в стадии сшивания, чтобы обеспечить различные пути образования поперечных связей. Это также увеличивает количество кислородосодержащих функциональных групп в смолах.

(б) азотсодержащие соединения, которые являются активными в реакции поликонденсации, такие как мочевины, ароматические (анилин, м-аминофенол) и гетероароматические (меламин) амины. Это позволяет вводить определенные типы азотсодержащих функциональных групп в исходный полимер и конечный уголь и влиять на развитие мезопористой структуры как смол, так и конечных углей. Также как гидрохинон и резорцин, все азотсодержащие нуклеофильные модифицирующие реагенты, которые могут быть использованы, имеют два или более активных центра и являются более активными в реакции конденсации, чем фенол или новолачные смолы. Это означает, что они первыми вступают в реакцию с первичными сшивающими агентами, образующими вторичные сшивающие агенты *in situ*.

Нуклеофильный компонент может быть предоставлен самостоятельно или в сочетании с катализатором полимеризации, который может быть слабой органической кислотой смешивающейся с новолаком и/или растворимой в порообразователе, например салициловой кислотой, щавелевой кислотой или фталевой кислотой. Поскольку они могут быть использованы в настоящем изобретении, применение одного

фенола является предпочтительным для того, чтобы свести к минимуму концентрацию более гидрофильных участков.

Концентрация новолака в порообразователе может быть такой, чтобы в сочетании с раствором сшивающего агента в том же порообразователе общее массовое соотношение порообразователя и смеси "новолак + сшивающий агент" было равно по меньшей мере 150:100 по массе. Фактические соотношения новолак порообразователь и сшивающий агент: порообразователь устанавливаются в соответствии с удобством применения, например в случае способа, описанного в патенте WO 2008/043983 (Tennison) согласно эксплуатационным требованиям к оборудованию по производству микросфер контролируется вязкость раствора новолак:порообразователь таким образом, чтобы он оставался пригодным для перекачивания, и соотношение сшивающий агент:порообразователь таким образом, чтобы сшивающий агент оставался в растворе по всему оборудованию.

Сшивающие агенты для фенольных смол.

Сшивающий агент обычно используют в количестве от 5 до 40 частей по массе (мас.ч.) на 100 мас.ч. нуклеофильных компонентов, например новолака. Им может быть, например, альдегид, в частности формальдегид или фурфурол, также им может быть гексаметилентетрамин (уротропин), или гидроксиметилированный меламина.

Предпочтительно использовать в качестве сшивающего агента уротропин. Для поперечного сшивания новолачной смолы его предпочтительно используют в количестве от 10 до 25 мас.ч., например, примерно от 15 до 20 вес.ч. уротропина на 100 мас.ч. новолака. Это обеспечивает формирование твердой смолы с максимальной степенью сшивки и обеспечивает стабильность структуры макропор при последующем удалении порообразователя.

Порообразователи.

Порообразователь также действует как растворитель. Поэтому порообразователь предпочтительно используют в количестве, достаточном для растворения компонентов системы смолы; массовое соотношение порообразователя к общей сумме компонентов системы смолы предпочтительно составляет по меньшей мере 1,5:1. Ниже этого уровня образующиеся смолы, по существу, не содержат никаких макропор.

Подробная информация о подходящих порообразователях приведена в патенте US 2008025907 A1 (Tennison). Порообразователь может представлять собой, например, диол, простой эфир диола, циклический сложный эфир, замещенный циклический или линейный амид или аминспирт, например этиленгликоль, 1,4-бутиленгликоль, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль,  $\gamma$ -бутиролактон, пропиленкарбонат, диметилформамид, N-метил-2-пирролидинон и моноэтаноламин, причем предпочтительным является этиленгликоль, а выбор ограничен также термическими свойствами растворителя, который не должен кипеть или иметь избыточное давление пара при температурах, используемых в процессе отверждения.

Считают, что механизм образования мезо- и макропор обусловлен процессом разделения фаз, который происходит во время реакции образования поперечных связей. При отсутствии порообразователя в процессе того, как линейные цепи преполимера подвергаются сшиванию, их молекулярная масса на начальной стадии возрастает. Оставшиеся компоненты с низкой молекулярной массой становятся неразрывными в областях с более высокой молекулярной массой, что вызывает отделение фазы сшитых доменов с высокой молекулярной массой от непрерывной фазы с более низкой молекулярной массой. Далее происходит конденсация легких компонентов с внешней стороны растущих доменов до тех пор, пока сшитая фаза не станет, по существу, непрерывной с захваченными между доменами остатками преполимера с низкой молекулярной массой. В присутствии небольшого количества (например, менее 120 частей на 100 частей новолака для реакционной системы "новолак-уротропин-этилен гликоль") порообразователя последний, являясь совместимым со сшитыми доменами смолы, остается внутри них, тогда как оставшийся преполимер образует между доменами раствор с частично сшитым полимером. В присутствии более высоких уровней порообразователя, которые превышают емкость сшитого полимера, порообразователь прибавляется к полимерной фракции с низкой молекулярной массой, увеличивая объем материала в пустотах между доменами, что приводит к мезопористости и/или макропористости. В целом, чем выше содержание порообразователя, тем шире мезопоры, вплоть до размера макропор, и тем больше объем пор.

Этот механизм разделения фаз предоставляет различные способы управления образованием пор в сшитых структурах смолы. Они включают химический состав и концентрацию порообразователя; химический состав и количество сшивающих электрофильных агентов, наличие, химическую природу и концентрацию модифицирующих нуклеофильных агентов, химический состав фенольных нуклеофильных компонентов (фенол, новолак), присутствие воды в растворителе и концентрацию любого катализатора для отверждения, если таковой имеется.

Производство предшественника смолы и угля в форме микросфер.

В патенте US 2008025907 A1 раскрывается производство смолы как в форме порошка, так и в форме микросфер. Производство микросфер может осуществляться путем заливки раствора частично сшитого преполимера в горячую жидкость, такую как минеральное масло, содержащее диспергирующий агент, и перемешивания этой смеси. Раствор преполимера образует микросферы, которые изначально являются жидкими, а затем в процессе отверждения становятся твердыми. Средний размер микросфер контроли-

руется несколькими параметрами процесса, включая тип и скорость мешалки, температуру и вязкость масла, вязкость раствора преполимера и объемное отношение раствора к маслу, причем средний размер может быть установлен в пределах между 5 и 2000 мкм. Затем микросферы могут быть отфильтрованы от масла. В препаративном примере промышленную новолачную смолу смешивают с этиленгликолем при повышенной температуре, смешивают с уротропином и нагревают до получения вязкого раствора, который заливают в минеральное масло, содержащее олифу, после чего смесь дополнительно нагревают до эффекта отверждения. По окончании отверждения реакционную смесь охлаждают, после чего полученный пористый полимер отфильтровывают и промывают горячей водой для удаления порообразователя. Отвержденные микросферы обжигают до получения пористых углеродных микросфер, которые имеют пористую структуру, как указано выше, и могут быть активированы, как указано выше. Микросферы могут быть изготовлены с узким распределением размеров частиц, например, с соотношением диаметров частиц D90:D10 лучше, чем 10 и предпочтительно лучше, чем 5.

Патент US 2010/0086469 A1 (Tennison) описывает и заявляет способ получения дискретных твердых микросфер из полимерного материала, например фенольной смолы, имеющих пористую структуру, процесс производства которых может давать гранулы смолы в промышленных масштабах без монтажа агрегатов для получения смолы, быстро и без остановки производства. Способ включает такие стадии: (а) объединение потока полимеризуемого жидкого предшественника, например новолака и уротропина, в качестве сшивающего агента, растворенных в первой полярной органической жидкости, например этиленгликоле, с потоком жидкой суспензионной среды, являющейся второй неполярной органической жидкостью, с которой жидкий предшественник, в значительной степени или полностью не смешивается, или например, с трансформаторным маслом, содержащим олифу; (б) перемешивание объединенного потока для того, чтобы диспергировать полимеризуемый жидкий предшественник в виде капель в суспензионной среде, используя, например, совмещенный с трубой статический смеситель; (в), полимеризация капель в ламинарном потоке суспензионной среды, с тем, чтобы сформировать дискретные твердые микросферы, которые не могут агломерировать; и (г) удаление микросфер из суспензионной среды.

Дисперсионная среда.

При производстве микросфер порообразователь включает полярную органическую жидкость, например этиленгликоль, выбранный в комбинации с дисперсионной средой, которая является неполярной органической жидкостью, для того чтобы образовать в значительной степени или полностью несмешивающуюся комбинацию, поскольку чем больше несовместимость между порообразователем, который образует дисперсную фазу, и дисперсионной средой, тем меньше становится экстракция порообразователя в дисперсионную среду. Желательно, чтобы порообразователь имел большую плотность, чем дисперсионная среда, с которой он должен быть использован, тогда капельки порообразователя, содержащие растворенные компоненты смолы, будут проходить через колонку быстрее, чем нисходящий поток дисперсионной среды. Как протонные, так и апротонные растворители различных классов органических соединений соответствуют этим требованиям и могут быть использованы в качестве порообразователей как индивидуально, так и в смеси. В дополнение к растворению реагирующих компонентов и какаого-либо катализатора порообразователь также в случае фенольных смол должен быть совместимым с водой и/или другими минорными продуктами конденсации (например, аммиаком), которые образуются путем отщепления в процессе реакции полимеризации, причем порообразователь предпочтительно является хорошо смешивающимся с водой, поэтому она может быть легко удалена из полимерных микросфер смолы путем промывки.

Дисперсионная среда представляет собой жидкость, которая может быть нагрета до температуры, при которой осуществляется отверждение, например до 160°C, без кипения при атмосферном давлении и без разложения, и которая не смешивается с этиленгликолем и растворенными в нем компонентами. Это может быть трансформаторное масло на углеводородной основе, которое представляет собой минеральное масло, и является побочным продуктом перегонки нефти. Оно может состоять в основном из алканов C<sub>15</sub>-C<sub>40</sub> и циклоалканов, имеющих плотность 0,8-0,9 в зависимости от марки и точку кипения при атмосферном давлении 260-330°C также в зависимости от марки. Трансформаторное масло имеет вязкость примерно 0,5 П при 150°C, которая является типичной температурой отверждения. Трансформаторное масло или другая дисперсионная среда может быть использована в объемах превосходящих в 3-10 раз объем объединенных потоков нуклеофильного предшественника и сшивающего агента; в частности примерно в 5 раз.

Диспергирующие агенты.

Предпочтительные диспергирующие агенты, которые растворяют в дисперсионной среде перед тем, как среда приходит в соприкосновение с реакционной смесью, поскольку они должны быть диспергированы в ней для того, чтобы замедлить коалесценцию капель, или продаются как высыхающие масла, например датское масло, или получают путем частичного окисления предшественников природного происхождения, таких как тунговое масло, льняное масло и т.д. Диспергирующие агенты расходуются по мере того, как протекает процесс, причем таким образом, что, если дисперсионная среда рециркулирует, то диспергирующий агент в оборотном масле должны быть пополнен. Диспергирующий агент удобно поставлять потоком в виде раствора в дисперсионной среде, в частности в трансформаторном масле, в

котором используется, например в количестве 5-10 об.%, датское масло, содержащее низкую концентрацию активного компонента для того, чтобы достичь конечной концентрации диспергирующего агента в дисперсионной среде равной 0,2-1 об.%. В случае окисленных растительных масел должны быть использованы более высокие концентрации диспергирующего агента.

Удаление растворителя из микросфер смолы и гранулированных материалов.

Микросферы смолы или гранулы, образованные, как описано выше, должны быть сначала обработаны с целью удаления порообразователя, после чего они могут быть подвергнуты обжигу и активированы. Порообразователь может быть удален или промыванием водой, или вакуумной сушкой. Микросферы могут быть обработаны сразу же после этого. Если применяется промывание водой, то предпочтительно используют, по меньшей мере, двухстадийный способ с использованием горячей воды при  $\sim 80^{\circ}\text{C}$ . Его предпочтительно проводят с помощью процесс каскадной промывки, в которой вода из второй стадии, содержащая относительно низкий уровень порообразователя, рециркулирует на первую стадию промывки. Сточные воды от первой стадии, содержащие высокий уровень порообразователя, могут быть либо сброшены, либо порообразователь может быть восстановлен из них с помощью перегонки. Вакуумная сушка может быть проведена с использованием любых коммерчески доступных вакуумных сушилок, хотя предпочтительно, чтобы был использован перемешивающийся или движущийся слой, а не система с неподвижным лотком.

Обжиг и активация структур смолы.

В патенте US 2010/0098615 A1 (Tennison; содержание которого включено в настоящее описание путем ссылки) предусмотрен процесс обжига и активации микросфер или гранулированного полимерного материала, и в особенности твердых микросфер из полимерного материала, полученных в результате процесса по патенту US 2010/0086469, который включает подачу материала к вращающейся печи с внешним обогревом, поддерживаемой при температурах обжига и активации; причем, печи, имеющей нисходящий уклон для того, чтобы способствовать движению материала при его вращении; печи, содержащей атмосферу, свободную от кислорода, представленную противотоком диоксида углерода или пара, и имеющей кольцевой затвор, установленный с интервалом вдоль печи для того, чтобы контролировать движение материала.

В качестве альтернативы полимерные микросферы могут быть подвергнуты обжигу и активированы в меньшем масштабе с использованием печи периодического действия. При этом обжиг и активация могут быть выполнены в виде отдельных стадий, когда обжиг проходит в атмосфере диоксида углерода при температуре  $\sim 800^{\circ}\text{C}$ , а активацию проводят в атмосфере диоксида углерода при температуре между  $850$  и  $950^{\circ}\text{C}$  или в атмосфере пара при температуре между  $700$  и  $850^{\circ}\text{C}$ .

Для целей настоящего изобретения предпочтительно использовать в качестве активирующей среды диоксид углерода, хотя можно также использовать другие среды.

Использование пористых углеродных частиц при лечении заболеваний печени.

Пористые углеродные частицы, описанные выше, могут быть использованы для лечения или профилактики заболеваний печени. Печеночная недостаточность является заключительным этапом болезни печени. Печеночная недостаточность делится на типы в зависимости от быстроты ее наступления. Острая печеночная недостаточность развивается быстро, но развитие хронической печеночной недостаточности может занять месяцы или годы. По определению, печеночная недостаточность возникает, если печень настолько больна и так плохо функционирует, что очевидна энцефалопатия. Любое прогрессирующее заболевание печени может привести к печеночной недостаточности; примеры ее включают ацетаминофеновую токсичность, цирроз печени, вирусный гепатит и метастатический рак печени. Другие признаки заболевания печени, такие как желтуха, асцит, печеночный запах изо рта и нарушение свертывания крови показывают, что печень испытывает затруднения, выполняя свои нормальные физиологические функции, но это не определяется как печеночная недостаточность, пока не появятся изменения психического состояния.

Прогноз для пациентов с заболеваниями печени трудно оценить, потому что это состояние имеет много причин.

Соответственно, настоящее изобретение может относиться к лечению или мерам профилактики у человека, чья печень является декомпенсированной или у которого налицо печеночная энцефалопатия. Печень такого человека может быть в состоянии компенсации. Данный человек может иметь хроническое заболевание печени. Этот человек может иметь цирроз печени, например, с алкогольным гепатитом или без него. Человек может иметь острую печеночную недостаточность. Данный человек может иметь печеночную энцефалопатию.

Начало острой и хронической болезни печени может быть связано с действием ксенобиотиков. Например, человек может быть подвергнут действию химического препарата, или некоторого другого агента, который вызывает повреждение печени. Человек может иметь реакцию на продаваемый в розницу, предписанный или принятый в качестве "развлечения" препарат, который вызывает повреждение печени. Такой человек может принимать Резулин<sup>TM</sup> (Троглитазон; Parke-Davis), Серозон<sup>TM</sup> (нефазодон; Bristol-Myers Squibb) или другие препараты, которые, как думается, вызывают повреждение печени. Человек может относиться к тем, кто имел передозировку конкретного препарата или превысил рекомендуемую

дозировку лекарств, способных вызвать повреждение печени. Например, такой человек может принять повышенную дозу парацетамола. Человек может испытать воздействие химических веществ, которые способны вызвать повреждение печени, например на рабочем месте. В частности, данный человек может подвергнуться действию этих химикатов в промышленных или сельскохозяйственных условиях. Особь может употребить растения, которые содержат соединения, способные вызвать повреждение печени, в частности это может случиться, если данная особь является животным, например травоядным. Например, особь может употребить растение, содержащее пирролизидиновый алкалоид, такое как крестовник. Особь может быть подвергнута действию токсинов из окружающей среды, которые, как предполагается, вызывают болезнь печени.

Лекарственно обусловленная гепатотоксичность включает более 50% всех случаев острых заболеваний печени (острой печеночной недостаточности). Токсичность, обусловленная ацетаминофеном (также известным как парацетамол и N-ацетилпара-аминофенол) является наиболее распространенной причиной острой печеночной недостаточности в США и Великобритании. Употребляющие на протяжении долгого времени от умеренных до высоких доз алкоголя лица, которые принимают ацетаминофен в терапевтических или незначительно повышенных дозах, подвергаются риску тяжелого повреждения печени и, возможно, острой печеночной недостаточности. Употребление алкоголя усиливает токсическое воздействие парацетамола. Идиосинкразическая токсичность препарата также способствует острой печеночной недостаточности. Идиосинкразическая токсичность препарата, как полагают, представляет собой реакцию гиперчувствительности, при которой человек реагирует на лекарства аномальным с фармакологической точки зрения образом. Такой ненормальный ответ может привести к острой печеночной недостаточности.

Острая печеночная недостаточность или хроническое заболевание печени может быть вызвано инфекцией патогенным организмом. Например, заболевание печени может быть связано с вирусной инфекцией. В частности, человек может быть инфицирован или был инфицирован вирусом, который вызывает гепатит. У человека может быть хронический вирусный гепатит. Вирус может, например, быть гепатитом, вызванным вирусом В, С или D. В некоторых случаях, в частности, когда человек имеет вирусный гепатит, этот человек может быть также инфицирован ВИЧ-I или ВИЧ-II. Человек может быть болен СПИД. Вполне возможно, что человек был или является инфицированным другими организмами, которые вызывают заболевание печени, в частности теми, которые присутствуют в печени в течение некоторой стадии их жизненного цикла. Например, человек может быть заражен или был заражен печеночной двуусткой.

Человек может иметь наследственное заболевание, которое вызывает или увеличивает риск хронического заболевания печени. Например, человек может иметь одну или несколько болезней печени, таких как гемохроматоз, болезнь Вильсона или дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина. Человек может иметь наследственное заболевание, которое вызывает своего рода структурную или функциональную патологию печени, что увеличивает вероятность фиброза печени. Человек может быть генетически предрасположен к развитию аутоиммунного нарушения, которая поражает печень и, следовательно, может способствовать фиброзу печени.

Хронические заболевания печени могут быть вызванные алкоголем. Мужчина или женщина, нуждающиеся при лечении, могут быть, или были, алкоголиками. Он или она могут потреблять или потребляли в среднем 50 или более единиц алкоголя в неделю, 60 или более единиц алкоголя в неделю, 75 или более единиц алкоголя в неделю и даже 100 или более единиц алкоголя в неделю. Мужчина или женщина могут потреблять или потребляли в среднем до 100 единиц алкоголя в неделю, до 150 единиц алкоголя в неделю и даже до 200 единиц алкоголя в неделю. Измерение одной единицы алкоголя в разных странах различается. Так, в соответствии со стандартом Великобритании, одна единица равна 8 г этанола.

Мужчина или женщина, возможно, потребляли такие уровни алкоголя в течение 5 и более лет, 10 или более лет, 15 и более лет или 20 или более лет. Человек, возможно, потреблял такие дозы алкоголя до 10, до 20, до 30 и даже до 40 лет. В случае заболевания алкогольным циррозом печени человек может быть в возрасте, например, 25 лет и старше, 35 лет и старше, 45 лет и старше и даже более 60 лет.

Человек может быть мужчиной или женщиной. Женщины могут быть более восприимчивы к неблагоприятным эффектам алкоголя, чем мужчины. У женщины алкогольные хронические заболевания печени могут развиваться в более короткие сроки и при меньших количествах алкоголя, чем мужчин. Как представляется, не существует одного единственного фактора, который следует учитывать при повышенной восприимчивости к алкогольному поражению печени у женщин, но эффект гормонов на метаболизм алкоголя может играть важную роль.

Таким образом, человек может страдать алкогольным гепатитом. Алкогольный гепатит может варьировать от легкого гепатита, при котором единственным признаком болезни являются аномальные лабораторные тесты, до тяжелой дисфункции печени с такими осложнениями, как желтуха (пожелтение кожи, вызванное задержкой билирубина), печеночная энцефалопатия, асцит, кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода, нарушение свертывания крови и кома.

Человек может иметь одно или несколько состояний из множества других состояний, известных тем, что они приводят к таким повреждениям печени, как, например, первичный билиарный цирроз пе-

чени, аутоиммунный хронический активный гепатит и/или шистосомоз (паразитарная инфекция). У человека может быть или была блокада желчных протоков. В некоторых случаях основная причина заболеваний печени может быть неизвестна. Например, человеку может быть поставлен диагноз криптогенного цирроза печени. Соответственно, у этого человека можно подозревать любое из состояний, перечисленных в настоящем изобретении.

Методы диагностики заболеваний печени, таких как острая печеночная недостаточность и печеночная энцефалопатия, хорошо известны в данной области искусства и, в частности, врачам и ветеринарам из этой области.

Предпочтительно, чтобы человек был диагностирован как имеющий заболевания печени и печеночную энцефалопатию, например специалистом в области медицины или ветеринарии. У человека может проявляться один или несколько симптомов, связанных с заболеванием печени, таких как желтуха, асцит, изменения кожи, задержка жидкости, изменения ногтей, легко возникающие кровоподтеки, кровотечения из носа, варикозное расширение вен пищевода, а у особой мужского пола может наблюдаться увеличение грудных желез. У человека может проявляться истощение, усталость, потеря аппетита, тошнота, слабость и/или потеря массы. У человека может также проявляться один или несколько симптомов, связанных с печеночной энцефалопатией, такие как спутанность сознания, дезориентация, деменция, ступор, кома, отек мозга, полиорганная недостаточность (нарушение дыхания, сердечно-сосудистая недостаточность или почечная недостаточность), мышечная тугоподвижность/ригидность, судороги или нарушение речи. Человек, нуждающийся в лечении, может принимать другие препараты для лечения заболеваний печени или может не принимать их. Человек, нуждающийся в лечении, может иметь риск развития печеночной энцефалопатии.

Заболевания печени, возможно, были или могут быть подтверждены физическим обследованием, включая такие методы, как УЗИ. Для того чтобы найти проявления фиброза, некротических клеток, клеточной дегенерации и/или воспаления и других характерных особенностей заболевания печени может быть проведена биопсия печени. Человеку может быть проведена оценка функции печени для того, чтобы определить, представляют ли они угрозу для этого человека. Могут быть охарактеризованы природа и основная причина заболевания печени. Может быть определена какая-либо история проявления возбудителей болезни печени.

Человек, нуждающийся в лечении, может быть подвержен риску приступов печеночной энцефалопатии, например пациенты, ожидающие пересадки печени, хирургические больные и/или пациенты с портальной гипертензией. Человек, подверженный риску приступов печеночной энцефалопатии, является человеком, который не перенес никаких приступов печеночной энцефалопатии или не имел какого-либо приступа печеночной энцефалопатии в течение длительного периода времени (около 12 недель или дольше), но имеет расстройство или медицинское состояние, которое создает риск приступов печеночной энцефалопатии. Приступ печеночной энцефалопатии представляет собой клиническое состояние, характеризующееся наличием церебральной дисфункции у пациентов с болезнью или нарушением функции печени. Существует широкий спектр психических расстройств при печеночной энцефалопатии, которые варьируют от минимальных, при которых главными результатами является снижение качества жизни, до явного эффекта, который приводит к коме и, в конечном итоге, к смерти.

Человеком, к которому применяют способ по настоящему изобретению, может быть пациент с пересадкой печени, индивидуум, страдающий от реперфузионного повреждения, например, в трансплантате после пересадки печени или пациент, подверженный риску развития или страдающий от уже развившейся полиорганной недостаточности.

Предпочтительно, чтобы заболевания печени выбирали из алкогольной болезни печени (АБП), неалкогольной болезни печени (например, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП)), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), цирроза и/или осложнений цирроза (например, портальной гипертензии, асцита, почечной недостаточности, печеночной энцефалопатии или обострения хронической печеночной недостаточности). Изобретение может относиться к лечению или профилактике воспаления и фиброза при хронических заболеваниях печени, таких как АБП, НАЖБП или вирусный гепатит.

Пористые углеродные частицы, описанные выше, также могут быть полезны в модуляции функциональной оси "кишечник-печень". Поэтому частицы могут также найти применение при других состояниях, когда важна кишечная транслокация, например, при ишемической болезни сердца, воспалительных заболеваниях кишечника, синдроме раздраженной толстой кишки и воспалении илеоанального кармана. Они также могут быть полезны при лечении или предупреждении артериальной гипертензии и, следовательно, при инсультах, а также для лечения или профилактики ожирения или осложнений ожирения.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу модуляции функциональной оси "кишечник-печень", включающему введение эффективного количества пористых углеродных частиц, описанных в данном изобретении, и использованию пористых углеродных частиц, описанных в настоящем изобретении, при изготовлении лекарственного средства для модуляции функциональной оси "кишечник-печень". Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики болезни коронарных артерий, воспалительных заболеваний кишечника, синдрома раздраженного кишечника,

воспаления илеоанального кармана, гипертензии, инсульта, ожирения или осложнений ожирения, включающему введение эффективного количества пористых углеродных частиц, описанных в данном изобретении, и использованию пористых углеродных частиц, описанных в настоящем изобретении, при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики болезни коронарных артерий, воспалительных заболеваний кишечника, синдрома раздраженного кишечника, воспаления илеоанального кармана, гипертензии, инсульта, ожирения или осложнений ожирения.

Пористые углеродные частицы по настоящему изобретению могут быть введены в различных лекарственных формах. Так, пористые углеродные частицы могут быть введены перорально, например в виде таблеток, пастилок, лепешек, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул. Пористые углеродные частицы также могут быть введены парентерально или подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, трансдермально или путем инфузии. Пористые углеродные частицы могут быть также введены ректально, например в форме суппозитория. Врач сможет определить необходимый путь введения для каждого конкретного пациента. Предпочтительно, чтобы пористые углеродные частицы вводили перорально или ректально. При введении перорально или ректально, пористые углеродные частицы действуют в просвете кишечника, поскольку они не являются рассасывающимися. Предпочтительно, чтобы пористые углеродные частицы вводили перорально, например, в свободно-текучей форме (удачно представленной в виде пакетиков) или в таблетированной форме.

В другой форме осуществления настоящего изобретения пористые углеродные частицы могут быть использованы в способе обработки крови экстракорпорально, путем прохождения крови через медицинское устройство, содержащее углеродные частицы, прежде чем она будет возвращена в организм, причем, эта кровь является кровью человека, страдающего заболеванием печени. Этот метод может быть выполнен с помощью любых подходящих средств. Кровь, которая была обработана таким образом, может быть возвращена в организм человека с терапевтическими целями или может быть использована для других целей. Например, кровь может быть обработана таким способом перед переливанием ее другому человеку.

Композиция из пористых углеродных частиц будет зависеть от таких факторов, как природа конкретного агента в зависимости от того, предназначена ли она для фармацевтического или ветеринарного использования и т.д. Агент, который должен быть использован для лечения заболеваний печени, может быть приготовлен для одновременного, раздельного или последовательного применения.

Пористые углеродные частицы в настоящем изобретении приготовлены, как правило, для введения с носителем или разбавителем, приемлемым с фармацевтической точки зрения. Используемым фармацевтическим носителем или разбавителем может быть, в частности, изотонический раствор. Например, твердые пероральные формы могут содержать наряду с активным соединением разбавителя, в частности лактозу, декстрозу, сахарозу, целлюлозу, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; смазывающие вещества, например диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния или кальция и/или полиэтиленгликоли; связывающие агенты; например крахмалы, гуммиарабик, желатин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливинилпирролидон; дезагрегирующие агенты, например крахмал, альгиновую кислоту, альгинаты или натрия крахмал гликолят, вспенивающие смеси; красители; подсластители; смачивающие агенты, такие как лецитин, полисорбаты, лаурилсульфаты; и, в целом, нетоксичные и фармакологически неактивные вещества, используемые в фармацевтических препаратах. Такие фармацевтические препараты могут быть приготовлены известным образом, например, с помощью смешивания, гранулирования, таблетирования, нанесения сахарного или пленочного покрытия.

Жидкие дисперсии для перорального введения могут представлять собой сиропы, эмульсии или суспензии. Сиропы могут содержать в качестве носителей, например, сахарозу или сахарозу с глицерином и/или маннит и/или сорбит.

Суспензии и эмульсии могут содержать в качестве носителя, например, природную смолу, агар, альгинат натрия, пектин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливиниловый спирт. Суспензии или растворы для внутримышечных инъекций могут содержать наряду с активным соединением приемлемый с фармацевтической точки зрения носитель, например стерильную воду, оливковое масло, этилолеат, гликоли, например, пропиленгликоль, и, если требуется, соответствующее количество гидрохлорида лидокаина.

Композиции для перорального введения могут быть приготовлены в виде составов с контролируемым высвобождением, например, они могут быть разработаны для контролируемого высвобождения в толстой кишке.

Растворы для внутривенного введения или инфузии могут содержать в качестве носителя, например, стерильную воду или, предпочтительно, могут находиться в форме стерильных, водных, изотонических солевых растворов.

Доза пористых углеродных частиц может быть определена в соответствии с различными параметрами, в частности в соответствии с используемым веществом; возрастом, массой и состоянием пациента, подлежащего лечению; путем введения и требующимся режимом.

Также, врач сможет определить необходимый путь введения и дозы для любого конкретного пациента. Типичная суточная доза составляет от примерно 0,1 до 2 г на кг массы тела в зависимости от воз-



раста, массы и состояния индивидуума, подвергаемого лечению, типа и тяжести дегенерации, а также частоты и пути введения. Суточная доза может быть равна, например, от 0,5 до 15 г, предпочтительно от 1 до 10 г, или, если это необходимо, то могут быть использованы более высокие суточные дозы, например от 10 до 100 г, предпочтительно от 20 до 80 г.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в этом описании, относятся к уровню специалистов в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

Все публикации и патентные заявки включены в настоящее описание путем ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка должна была бы конкретно и отдельно быть включена путем ссылки.

Хотя выше изобретение с целью его понимания было описано в некоторых деталях при помощи иллюстраций и примеров, специалистам в данной области техники должно быть ясно, что могут быть применены определенные изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие ниже примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

#### **Некоторые аспекты изобретения**

Некоторые аспекты изобретения описаны ниже.

1) Пористые углеродные частицы для применения при лечении или профилактике заболеваний печени, в которых по меньшей мере 20% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм.

2) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 1, в которых по меньшей мере 20% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 150 нм.

3) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 1 или 2, в которых по меньшей мере 20% общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 50 до 120 нм.

4) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, в которых поры составляют по меньшей мере 25% общего объема пор.

5) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, в которых поры составляют от 30 до 60% общего объема пор.

6) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где эти частицы дополнительно содержат микропоры со средним диаметром в диапазоне от 0,6 до 2 нм.

7) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 6, в которых микропоры составляют от 5 до 30% общего объема пор.

8) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где частицы дополнительно содержат поры, имеющие диаметр более 200 нм.

9) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 8, в которых поры, имеющие средний диаметр более чем 200 нм, составляют от 25 до 70% от общего объема пор.

10) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, в которых общий объем пор, имеющих средний диаметр от 30 до 150 нм, составляет от 0,2 до 2,0 см<sup>3</sup>/г.

11) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из аспектов от 6 до 10, в которых общий объем микропор, имеющих средний диаметр от 0,6 до 2 нм, составляет от 0,01 до 1,5 см<sup>3</sup>/г.

12) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из аспектов от 8 до 11, в которых общий объем макропор, имеющих средний диаметр больше, чем 200 нм, составляет от 0,2 до 1,0 см<sup>3</sup>/г.

13) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, у которых общая удельная площадь поверхности, измеренная методом БЭТ (Брунауэра-Эммета-Теллера) больше чем 700 м<sup>2</sup>/г.

14) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 13, у которых общая удельная площадь поверхности больше чем 1000 м<sup>2</sup>/г.

15) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 14, у которых общая удельная площадь поверхности составляет от 1400 до 2000 м<sup>2</sup>/г.

16) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где частицы имеют средний диаметр от 2 до 2000 мкм.

17) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где частицы имеют сферическую форму.

18) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где частицы вводят перорально или ректально.

19) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 18, где частицы вводят перорально в свободной-текучей форме или в форме таблеток.

20) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из предшествующих аспектов, где заболевание печени выбирают из алкогольной болезни печени (АБП), неалкогольной болезни печени, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), цирроза и/или осложнений цирроза.

21) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 20, где неалкогольная болезнь печени является неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП).

22) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с любым из аспектов от 1 до 19, используемые для лечения или профилактики воспаления и фиброза при хронических заболеваниях печени, таких как АБП, НАЖБП или вирусный гепатит.

23) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 20, где осложнение цирроза выбирают из портальной гипертензии, асцита, почечной недостаточности, печеночной энцефалопатии и обострения хронической печеночной недостаточности.

24) Способ лечения или профилактики заболеваний печени, включающий введение эффективного количества пористых углеродных частиц, в которых по меньшей мере 20% от общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм.

25) Применение пористых углеродных частиц, в которых по меньшей мере 20% от общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 2 до 200 нм, при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний печени.

26) Пористые углеродные частицы, как определено в любом из аспектов от 1 до 17 для применения с целью модуляции функциональной оси "кишечник-печень".

27) Пористые углеродные частицы для применения в соответствии с аспектом 26, используемые в лечении или профилактике ишемической болезни сердца, воспалительных заболеваний кишечника, синдрома раздраженной толстой кишки, воспаления илеоанального кармана, гипертензии, инсульта, ожирения и осложнений ожирения.

### Примеры

Материалы и методы.

Углеродные материалы.

Препаративный пример 1.

Раствор 100 мас.ч. промышленной новолачной смолы со средним молекулярным весом 700-800D (Hexion Specialty Chemicals) в этиленгликоле нагревали до 90-95°C и тщательно перемешивали в течение 2-5 мин с раствором 15-20 мас.ч. гексаметилентетрамина (уротропина) в этиленгликоле, нагретого до той же температуры. Полученный прозрачный раствор выливали потоком в 2,5-6-кратный объем перемешиваемого горячего (150-155°C) минерального масла с низкой вязкостью (изоляцияное масло или трансформаторное масло), содержащего 0,2-1 об.% диспергирующего агента, представлявшего собой промышленное высыхающее масло (датское масло), основным компонентом которого являются полиненасыщенные (окисленные) растительные масла. Температура смеси снижалась до 135-140°C, поэтому смесь нагревали до 150-155°C в течение 15-20 мин. Как правило, отверждение происходит в течение 1-2 мин около 140°C с последующим значительным выделением газа. Дальнейшее нагревание до 150-155°C в течение 15-20 мин обеспечивало завершение отверждения. Смесь охлаждали и отделяли полученные микросферы от масла путем фильтрации или центрифугирования. Этиленгликоль был удален из смолы либо при помощи многократной экстракции горячей водой, либо путем сушки в вакууме (120°C при 50 мм рт.ст.). В описанной выше процедуре, по сравнению с примером 3 из патента WO 02/12380, содержание уротропина было увеличено до 15-20 мас.ч. на 100 мас.ч. новолака по сравнению с 9 мас.ч. в ранее приведенном примере, а температуру масла, в которое заливают раствор смолы, увеличили с 115-120°C до 150-155°C, что вызывало "мгновенное" отверждение, а не "медленное" отверждение, как в ранее приведенном примере.

Промытые водой влажные, высушенные или высушенные под вакуумом микросферы смолы подвергали термообработке для получения углеродных материалов. Типичная процедура включает, без ограничений, обжиг в потоке диоксида углерода с наращиванием температуры от температуры окружающей среды до 800°C со скоростью 3°C/мин, классификацию по размерам частиц и дальнейшее "физическую" активацию выбранной фракции в потоке диоксида углерода при 900°C. Также может быть применено множество вариантов этой, известной в данной области, процедуры. Степень активации в этих образцах составляла примерно 30%.

Распределение мезо/макропор по размерам в полученных углях предопределяется пористостью смолы-предшественника, которая регулируется содержанием растворителя/порообразователя и степенью активации полученного угля. В табл. 1 ниже приводится подробная информация о четырех полимерных композициях, которые являются предшественниками мезо/макропористых углей, как показано с помощью исследований активированных материалов методами порометрии на основе адсорбции азота и ртутной порометрии. В последующих биомедицинских испытаниях были использованы ТЕ7 и ТЕ8, которые имеют очень похожую структуру макропор, представляя собой в преимущественной степени микро - макропористые материалы. Материалы ТЕ3 и ТЕ5, которые имеют поры меньшего размера в мезо/макро области, приведены в качестве примера и показывают худшие эксплуатационные свойства при адсорбции крупных молекул, таких как ФНОα.

Распределение частиц по размерам в образовавшихся микросферах смолы зависят от различных параметров, в том числе, без ограничений, от типа оборудования для перемешивания, скорости перемешивания, вязкости раствора смолы, концентрации диспергирующего агента, соотношения количества рас-

твора смолы к количеству масла и температуры дисперсии. Хотя распределение, как правило, является широким, размер преобладающей фракции может эффективно изменяться в пределах между ~10 мкм и ~1 мм.

Таблица 1

Код продукта	Раствор новолака		Раствор уротропина	
	Новолак	Этиленгликоль	Уротропин	Этиленгликоль
TE3	100 масс.ч.	80 масс.ч.	20 масс.ч.	100 масс.ч.
TE5	100 масс.ч.	100 масс.ч.	20 масс.ч.	120 масс.ч.
TE7	100 масс.ч.	150 масс.ч.	20 масс.ч.	150 масс.ч.
TE8	100 масс.ч.	150 масс.ч.	20 масс.ч.	180 масс.ч.

Фиг. 11 показывает рассчитанные распределения размеров пор (модель ВН) активированных углей, полученных из смол TE3, TE5 и TE7 соответственно (композиции из табл. 1). Распределения демонстрируют бимодальный характер угля для всех материалов, показывая большой пик в диапазоне микропор размером менее 2 нм и вторичный пик в диапазоне мезо/макропор размером 5-500 нм, причем, размер и объем пор возрастают с ростом концентрации порообразователя гликоля, как показано в табл. 1. Согласно измерениям с помощью метода адсорбции азота предпочтительные материалы TE7 и TE8 имеют мезо/малые макропоры большего размера в диапазоне 10-500 нм. Материал TE3 имеет значительно меньший объем пор и распределение размеров пор у него расширено вплоть до области малых мезопор (2-50 нм).

Препаративный пример 2. Активация микросфер после обжига.

Микросферы смолы могут быть активированы либо диоксидом углерода, либо паром. Диоксид углерода является более управляемым, тогда как пар является предпочтительным для крупномасштабных производств по стоимостным причинам. Активация в диоксиде углерода происходит примерно при 900°C, причем степень обгара контролируется временем пребывания в печи. Активация паром происходит преимущественно в пределах 700°C. В обоих случаях условия не являются критическими, температуру и время можно регулировать для того, чтобы достичь требуемой степени активации так, как известно любому специалисту в данной области. Эффект активации диоксидом углерода на примере пористой структуры микросфер TE8 показан на фиг. 3, а распределение размеров пор для нее приведено в табл. 2. Увеличение объема микропор видно из фиг. 3. Из табл. 2 можно также понять, что объем пор в неактивированном образце в диапазоне микропор (<2 нм) очень низок (0,1 см<sup>3</sup>/г), причем он также соответствует малой площади поверхности по методу БЭТ (534 м<sup>2</sup>/г). Активация по меньшей мере до 30% обгара значительно увеличивает как объем микропор, так и площадь поверхности. Предпочтительные материалы для биомедицинского адсорбции имеют площадь поверхности по меньшей мере 1000 м<sup>2</sup>/г, объем микропор более 0,3 см<sup>3</sup>/г.

Таблица 2. Структура пор угля TE8, активированного CO<sub>2</sub>

Материал	Плотность, г/см <sup>3</sup>	Площадь БЭТ, м <sup>2</sup> /г	Общий объем пор (0,99), см <sup>3</sup> /г	Прирост объема пор		
				0-2 нм, см <sup>3</sup> /г	2-50 нм, см <sup>3</sup> /г	>50 нм, см <sup>3</sup> /г
Неактивированный TE8		534	0,9	0,101	0,136	0,56
Активированный с 29% обгара	0,22	1041	1,31	0,34	0,22	0,66
Активированный с 47% обгара	0,17	1432	1,67	0,96	0,355	0,81

Изменение объема макропор угля при активации является артефактом метода адсорбции азота, причем объем пор не должен быть >0,5 см<sup>3</sup>/г. Более крупные структуры пор следует измерять методом ртутной порометрии. Они показаны на фиг. 2 для TE7 и TE8, активированных до 40% обгара. Более крупные поры, выше 38000 нм, обусловлены межчастичными пустотами между микросферами, а не какой-либо внутренней пористостью в микросферах. Частицы TE7 и TE8 имеют максимумы составляющие для диаметров пор 88 и 91 нм соответственно, площади поверхности 1499 м<sup>2</sup>/г, объема пор 1,36 см<sup>3</sup>/г, объемной плотности 0,2 г/см<sup>3</sup>, размера частиц 240-500 мкм и степени активации 40%. Для обоих материалов является очевидным отсутствие пор больше основного максимума (>300 нм) так же, как в основном отсутствие пор в области мезопор (2-50 нм). Метод ртутной порометрии не может обеспечить данные о порах ниже ~6 нм из-за применяющегося давления.

Если не указано иное толкование, пористые углеродные частицы, использующиеся в следующих ни-

же исследованиях *in vitro* и *in vivo*, представляли собой активированные частицы TE7, описанные выше.

Исследования *in vitro*.

Исследование воздействия прямой контактной инкубации испытуемого угля на бактериальный метаболизм.

Углеродные материалы (TE7 или TE8, как указано) отвешивали в универсальные стеклянные флаконы и стерилизовали сухим жаром в течение 2 ч при 80°C. 1 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) добавляли к каждому 0,1 г материала, и образцы инкубировали при 37°C в течение 1 ч при встряхивании со скоростью 120 об/мин. Триптон-соевый бульон (ТСБ) инокулировали *Escherichia coli* (NCTC 10418) или *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) и инкубировали в течение ночи при 37°C и встряхивании со скоростью 120 об/мин. Бактериальную суспензию осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл ФСБ. Оптическую плотность суспензии измеряли при 540 нм и концентрацию суспензии доводили до значения 0,5. Этот коэффициент разбавления использовали затем для приготовления бактериальной суспензии в ФСБ. Подсчет жизнеспособных клеток в суспензии *E. coli* проводили путем серийного разведения и посева на чашках с агаром. Инокулят (1 мл) добавляли к каждому материалу и эти образцы инкубировали при 37°C, встряхивая со скоростью 120 об/мин. В определенные промежутки времени равные 30 мин, 2 и 6 ч 100 мкл бактериальной суспензии забирали из каждого образца и помещали в лунки 96-луночного планшета. Образцы подвергали лизису и анализировали на содержание АТФ в качестве меры клеточного метаболизма с использованием набора для определения жизнеспособности микробных клеток BacTiter-Glo (Promega).

Исследование воздействия фильтрата из углей на бактериальный метаболизм.

Углеродные материалы (TE8 и коммерчески доступный активированный уголь ACTIDOSE, назначаемый при отравлениях) отвешивали в универсальные стеклянные флаконы и стерилизовали сухим жаром в течение 2 ч при 120°C. 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) добавляли к каждому 0,2 г материала, и образцы инкубировали при 37°C в течение 24 ч, встряхивая со скоростью 120 об/мин. ТСБ инокулировали *E. coli* (NCTC 10418) или *Bacillus subtilis* и инкубировали в течение ночи при 37°C, встряхивая со скоростью 120 об/мин. Бактериальную суспензию осаждали центрифугированием и разбавляли ФСБ до получения конечной концентрации примерно  $1 \times 10^9$  бактерий в 1 мл. В 100-луночный планшет BIOScreen добавляли 100 мкл экстракта, 100 мкл инокулята и 100 мкл ТСБ и измеряли рост бактерий при помощи турбидиметрического анализатора BIOScreen, проводя мониторинг числа бактерий при 540 нм в течение 72 ч.

Исследование адсорбции эндотоксина испытуемым углем в зависимости от времени.

Удаление эндотоксина испытуемым углем TE8 измеряли при помощи LAL-теста Endosafe Endochrome-K (Charles River Laboratories UK) с лизатом амебоцитов мечехвоста (ЛАМ) и ридера Tecan Sunrise для инкубированных планшетов с программным обеспечением Endoscan-V. Для минимизации загрязнения эндотоксина использовали апиrogenную посуду и свободную от эндотоксина пластмассу. Испытуемые микросферы угля TE8 подвергали стерилизации сухим жаром при 250°C в течение трех часов. Угли предварительно смачивали искусственным кишечным соком (ИКК). ИКК готовили непосредственно перед каждым экспериментом согласно рецепту 26 Фармакопеи США (United States Pharmacopoeia) без панкреатина, используя воду из набора реагентов для LAL-теста. Стандартный раствор липополисахарида (ЛПС), полученного из *E. coli* 055:B5 готовили с концентрацией 200 ЕЭ/мл в ИКК. ИКК удаляли из угля путем аспирации и к каждому испытуемому углю добавляли ИКК с известным количеством эндотоксина в объемно-массовом соотношении 10 мл на 1 г угля. Испытуемые образцы и положительные контроли без угля инкубировали при 37°C со встряхиванием и 450 мкл образца отбирали во временных точках 0, 15, 30, 45 и 60 мин. Концентрацию эндотоксина в каждом образце рассчитывали в соответствии с инструкциями изготовителя по стандартной кривой, полученной с помощью разведений от 0,005 до 50 ЕЭ/мл.

Исследование адсорбции ФНО испытуемым углем.

Различные навески углеродных микросфер (испытуемый уголь TE8) в диапазоне от 0,001 до 0,005 г помещали в помеченные стерильные пробирки типа Эппендорф в четырех экземплярах и предварительно смачивали 1 мл ИКК во встряхивающем инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. Эппендорфы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость удаляли и прибавляли ИКК с добавленными в него 10 нг/мл рекомбинантного ФНО. Испытуемые углеродные адсорбенты TE8 инкубировали при 37°C, встряхивая со скоростью 90 об/мин в течение 24 ч. Образцы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 3 мин и супернатант собирали и хранили при -20°C. Перед измерением концентрации ФНО по методу ELISA пробы разводили в растворе для разведения в соответствии с инструкциями изготовителя (BD Biosciences).

Исследование адсорбции ацетальдегида углем.

Различные навески углеродных микросфер (испытуемый уголь TE8) в диапазоне от 0,001 до 0,005 г помещали в помеченные стерильные пробирки типа Эппендорф в четырех экземплярах и предварительно смачивали 1 мл ИКК во встряхивающем инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. Добавляли точное количество (7,2 мМ; 0,1 г/мл) ацетальдегида (величина выборки  $n=3$ , среднее значение  $\pm$ СОС). Эппендорфы

центрифугировали при 8000 об/мин в течение 3 мин. Адсорбцию ацетальдегида (АТ) измеряли при помощи метода дериватизации с 2-дифенилацетил-1,3-индандион-1-гидразоном (ДИГ), применяя ВЭЖХ как метод обнаружения (фиг. 5В).

Исследования *in vivo*.

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с руководством Министерства внутренних дел Великобритании (Home Office guidelines) на основании законодательного акта UK Animals in Scientific Procedures Act 1986. Использовали самцов крыс линии Спрег-Доули (Sprague-Dawley; Charles River Laboratories UK Ltd.) с массой тела 280-300 г. Все крысы содержались в условиях вивария с 12-часовым режимом свет/темнота при температуре от 19 до 23°C и влажности примерно 50% и имели свободный доступ к стандартному порошкообразному корму для грызунов и воде.

Модель лигирования желчных протоков.

131 самца крыс линии Спрег-Доули подвергали перевязке желчного протока или имитации операции на желчевыводящих путях в условиях анестезии галотаном. Крысы получали одинаковое кормление в виде "порошкообразный корм ± гидратированный Mastcarbon размером частиц 250-500 мкм" (TE7) в дозе 0,4 г на 100 г массы тела в день; с момента спустя две недели после перевязки желчных протоков до завершения эксперимента спустя 4-5 недель после начальной операции. За 3,5 ч до завершения исследования четырем подгруппам внутрибрюшинно вводили липополисахарид из *Klebsiella* (ЛПС) (0,33 мг/кг). Исследовали следующие группы: ложноперирированные (n=15), ложноперирированные + уголь (n=17), ложноперирированные + ЛПС (n=11), ложноперирированные + ЛПС + уголь (n=10), ПЖП (n=22), ПЖП + уголь (n=25), ПЖП + ЛПС + уголь (n=10), ПЖП + ЛПС + уголь (n=16).

Исследования кишечной проницаемости.

Исследования кишечной проницаемости проводились за 1 день до завершения эксперимента. Животных помещали в метаболические клетки на всю ночь для акклиматизации. Исходные образцы мочи собрали в криопробирки и хранили при -70°C. Затем 0,6 мл раствора лактулозы (277 мМ), L(+)-рамнозы (10 мМ) и 3-метил-о-пиранозы (2,0 мМ) вводили через желудочный зонд и собрали мочу в течение последующих 5 ч. Образцы мочи анализировали с помощью масс-спектропии. Животные были возвращены обратно в групповые клетки для реакклиматизации и не получали корма до завершения исследований.

Гемодинамические измерения и отбор проб.

Под анестезией галотаном (5 мл/мин индукция и 2 мл/мин поддержка) был введен катетер во внутреннюю сонную артерию (наружный диаметр 0,96, полиэтиленовая трубка с тонким просветом, фирмы Portex, Scientific Laboratory Supplies Ltd., Nottingham, UK), как описано ранее. Катетер удерживался на месте введения в течение всего срока исследования с помощью проксимального и дистального удерживающих швов. Сигнал от катетера преобразовывали и определяли среднее артериальное давление. Затем проводили лапаротомию в стерильных условиях и в воротную вену помещали катетер. Сигналы от катетеров в сонной артерии и воротной вене преобразовывали. Сопутствующую плазму из артерии и воротной вены собирали в асептических условиях в пробирки с литий-гепарином и ЭДТА до тех пор, пока не достигалось состояние экссангвиниации. Затем печень перфузировали 5 мл охлажденного льдом ФСБ для того, чтобы достичь побледнения органа. Печень извлекали и помещали в 10 мл охлажденного льдом ФСБ. Плазму центрифугировали при 3500 оборотах в минуту в течение 10 мин при 4°C. Супернатант немедленно переносили в криопробирки и хранили при -70°C.

Двенадцатиперстную кишку, среднюю часть тощей кишки, терминальную часть подвздошной кишки и ободочную кишку собирали и хранили в формалине и консервирующем растворе для электронной микроскопии (200 мМ какодилата натрия, 4% глутаральдегида, pH 7,2-7,4). Гистологические образцы были собраны вместе с сосудистым руслом брыжейки без попытки орошения или обеззараживания просвета. Также были собраны образцы из всех четырех мест с последующим обеззараживанием просвета и орошением физиологическим раствором. Эти образцы немедленно переносили в криопробирки и хранили при -70°C. Печень, почки и ткани мозга также собирали и хранили в формалине и криопробирках и хранили при -70°C.

Выделение непаренхиматозных клеток печени.

Перфузированную ткань печени иссекали скальпелем и гомогенизировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса (с кальцием и магнием + 0,01% коллагеназа и 0,01% ДНКазы I). Гомогенат переносили в 50 мл пробирку фирмы Falcon и инкубировали при 37°C перед фильтрованием через клеточный фильтр с порами 100 мкм. Затем смесь центрифугировали в течение 5 мин при 500 об/мин и 4°C, после чего супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин и 4°C. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в растворе PF4 (сбалансированный солевой раствор Хенкса (ССРХ) без кальция или магния, 0,01% ДНКазы I, бычий сывороточный альбумин (0,25%)) и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин и 4°C. Затем осадок ресуспендировали в 3,9 мл среды RPMI 1640 и осторожно смешивали с 2,1 мл смеси среды RPMI 1640 и 22% OptiPrep. После этого сверху наслаивали RPMI с последующим центрифугированием в течение 25 мин без остановки при 2800 об/мин и 4°C. Непаренхиматозные клетки выделяли с поверхности раздела фаз, ресуспендировали в эквивалентном объеме PF4 и центрифугировали при 2000 об/мин и 4°C в течение 10 мин. Во всех последующих анализах использова-

ли  $10 \times 10^6$  клеток.

Фагоцитарная функция клеток Купфера.

Клетки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин при 4°C и супернатант отбрасывали. 200 мкл латексных микросфер, содержащих среду, добавляли к осадку и инкубировали при 37°C в темноте в течение 20 мин. Затем добавляли 5 мл охлажденного льдом ФСБ и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Осадок затем промывали 5 мл холодного ФСБ и центрифугировали. Затем добавляли блокирующие антитела к рецепторам Fc фрагментов иммуноглобулинов (Fc блокатор) и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Затем добавляли антитела Anti-CD163 и инкубировали в течение 10 мин при 4°C в темноте.

Продукция активных форм кислорода (АФК) клетками Купфера.

20 мкг/мл эндотоксина E.coli добавляли в образец непаренхиматозных клеток с концентрацией  $1 \times 10^6$  и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Для позитивного контроля использовали индуктор АФК с конечной концентрацией 200-500 мкМ. Затем образцы центрифугировали при 500д в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. После этого клетки ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера, центрифугировали при 500д в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 500 мкл раствора для обнаружения АФК и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в темноте. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера, добавляли Fc-блокатор (1:25) и инкубировали в течение 10 мин при 4°C. Добавляли антитела Anti-CD163 и инкубировали клетки в течение 30 мин при 4°C в темноте. Затем клетки промывали 1 мл FACS буфера, центрифугировали и ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера.

Анализ цитокинов.

Уровни ФНО, ИЛ-4, ИЛ-10 в крови воротной вены были определены с помощью набора BD™ Cytometric Bead Array (CBA). 50 мкл смешанных связывающих микросфер добавляли в каждую лунку предварительно смоченного планшета. Затем в лунки для анализа добавляли 50 мкл стандарта или образца. Планшет встряхивали в течение 5 мин с использованием цифрового шейкера со скоростью 500 об/мин и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 50 мкл смешанного реагента для обнаружения фикоэритрина (ФЭ) в каждую лунку для анализа. После этого планшет встряхивали в течение 5 мин с использованием цифрового шейкера со скоростью 500 об/мин и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшет подвергали вакуумной аспирации до тех пор, пока лунки не были осушены. 150 мкл промывочного буфера добавляли в каждую лунку для анализа. Затем планшет встряхивали в течение 5 мин с использованием цифрового шейкера со скоростью 500 об/мин для ресуспендирования микросфер. После этого образцы анализировали с помощью проточной цитометрии и проводили анализ данных, используя программное обеспечение FACS Diva.

Определение эндотоксина.

Для обнаружения эндотоксина использовали набор для хромогенного кинетического анализа с лизатом амебоцитов мечехвоста (ЛИАМ) (Charles River Laboratories). Плазму из воротной вены (100 мкл) разводили 1:10 в свободной от эндотоксина воде, и инкубировали при 75°C в течение 30 мин. 100 мкл образца и 100 мкл из LAL-реагента смешивали в 96-луночном планшете и анализировали при 405 нм на спектрофотометре с использованием программного обеспечения Endoscan V. Результаты выражали в виде ЕЭ/мл.

Изоляция нейтрофилов.

Цельную кровь (4 мл) от здоровых добровольцев наслаивали на 5 мл реагента Polymorphogrer и центрифугировали в течение 30 мин при 400g и комнатной температуре. Нейтрофилы собирали из второй поверхности раздела фаз и промывали ФСБ. Нейтрофилы подсчитывали и ресуспендировали в ФСБ до плотности  $5 \times 10^5$  в 50 мкл. Для анализа использовали 50 мкл клеточной суспензии и 50 мкл плазмы. Проводили оценку жизнеспособности.

Функция нейтрофилов.

Воздействие совместного инкубирования портальной венозной плазмы на окислительный взрыв и фагоцитоз нормальных человеческих нейтрофилов было определено с использованием набора для анализа Phagoburst and Phagotest. Набор Phagoburst (Orpagan Pharma) использовали для определения процентного содержания нейтрофилов, продуцирующих активные формы кислорода, как описано ранее (FACS Cantoll, BD bioscience). Набор Phagotest (Orpagan Pharma) использовали для измерения фагоцитоза с помощью FITC-меченых опсонизированных бактерий E.coli, как описано выше. После инкубации клеток и плазмы в течение 90 мин их промывали ФСБ и инкубировали с антителами CD16-PE (3 мкл) (Immunotools). Среднюю интенсивность флуоресценции соответствующих антител на нейтрофилы анализировали с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD bioscience).

Биохимический анализ.

Биохимический профиль определяли с использованием стандартных методов (COBAS).

Гистологический анализ.

Ткань печени обрабатывали в соответствии со стандартным протоколом и проводили окрашивание гематоксилином и эозином вместе с красителем Sirius Red. Гистологическое окрашивание проводилось

консультирующим гистопатологом с использованием 14 балльной системы оценки вторичного цирроза печени. Окрасивание красителем Sirius Red квантифицировали, используя компьютерный цифровой анализ изображений. Относительную площадь коллагеновых волокон определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений Zeiss KS300. Экспрессию толл-подобного рецептора 4 (ТЛР-4) в толстой кишке, печени и почках определяли при помощи иммуногистохимии.

Определение воды в тканях мозга.

Воду тканей мозга определяли количественно в соответствии со стандартным протоколом. 100 г ткани мозга помещали в инкубатор при 100°C в течение 24 ч, рассчитывали потери воды в процентах.

Статистический анализ.

Данные представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (СОС). Используемое программное обеспечение включало GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA).

Результаты.

Исследования *in vitro*.

Пример 1. Исследование воздействия прямой контактной инкубации испытуемого угля на бактериальный метаболизм.

Прямая инкубации испытуемого угля ТЕ8 с бактериальными суспензиями либо *E.coli*, либо *S.aureus* в ТСБ показала, что уголь ТЕ8 не влияет на рост бактерий обоих видов, последовавший после прямого контакта в течение периода времени от 4 до 6 ч (фиг. 6 и 7). Измерение люминесценции является косвенной мерой жизнеспособности клеток и количества клеток с помощью определения бактериальной АТФ. Уровни люминесценции, отражающие бактериальный метаболизм на образцах контакта, были сопоставимы с контролем без адсорбента для обоих видов за время хода эксперимента. В отличие от этого контрольный коммерческий уголь АСТИДОСЕ для перорального применения значительно снижает сигнал люминесценции всего лишь после 30-минутной инкубации бактерий с углем.

Пример 2. Исследование воздействия фильтрата из угля на бактериальный метаболизм.

Прямая инкубация фильтрата из угля ТЕ7 с бактериальными суспензиями либо *E.coli*, либо *Bacillus subtilis* в ТСБ показала, что фильтрат из угля ТЕ7 не влияет на рост бактерий для обоих видов в течение инкубации до 72 ч (фиг. 8 и 9). Измерение оптической плотности (ОП) является косвенной мерой числа бактерий. Значения ОП для образца ТЕ7 были сопоставимы с контролем без адсорбента для обоих видов за время хода эксперимента.

Пример 3. Исследование адсорбции эндотоксина испытуемым углем в зависимости от времени.

Концентрация эндотоксина, определенная в растворе ИКК, в котором концентрация первоначальной добавки эндотоксина составляла 200 ЕЭ/мл, снизилась с обнаруженного в момент времени 0 значения 160 до 30 ЕЭ/мл за последующие 60 мин инкубации с исследуемыми углями (фиг. 10). В контрольном растворе концентрация равная 160 ЕЭ/мл сохранялась постоянной в течение этого времени.

Пример 4. Исследование адсорбции ФНО испытуемым углем.

Способность испытуемого угля ТЕ8 к удалению цитокина воспаления ФНО из ИКК показана с помощью изотермы адсорбции (фиг. 11). Максимальное количество ФНО, адсорбированное углем ТЕ8 в равновесных условиях, было определено на уровне 10 мкг на 1 г угля.

Пример 5. Исследования *in vivo*.

Значительное снижение портального давления было обнаружено в группах ПЖП + ЛПС (среднее значение 18,05 мм рт.ст. в группе нелеченных животных, 10,17 мм рт.ст. в группе животных, получавших уголь,  $p=0,0007$ ) и ПЖП (среднее значение 12,57 мм рт.ст. в группе нелеченных животных, 11,02 мм рт.ст. в группе животных, получавших уголь,  $p=0,0043$ ) после лечения углем. Никаких существенных изменений в среднем артериальном давлении не наблюдалось (фиг. 14).

Значительное снижение аланин-трансаминазы (АЛТ) наблюдали в группе ПЖП, получавшей лечение углем, и группе ПЖП+ЛПС по сравнению с группами, не получавшей лечения. Лечение углем было связано со снижением АЛТ от 99 до 62 Ед/мл у ПЖП+ЛПС крыс ( $p=0,0152$ ) и от 71 до 52 Ед/мл ( $p=0,0422$ ) у ПЖП крыс (фиг. 12). У ПЖП и ПЖП+ЛПС крыс наблюдали увеличение численности популяции клеток Купфера. Лечение углем приводило к значительному сокращению показателей в обеих группах, приближая их к показателям контрольных ложнооперированных групп ( $p=0,0286$ ,  $p=0,0357$ ).

Общая продукция АФК в печени, как обнаружили, увеличивалась у ПЖП крыс по сравнению с ложнооперированными крысами в соответствии с увеличением повреждения печени. Лечение углем у ПЖП крыс было связано с заметным сокращением общей продукции АФК, приближаясь к ее значениям у ложнооперированных крыс. Фагоцитоз клеток Купфера, как наблюдали, усиливался у ПЖП и ПЖП+ЛПС крыс. При лечении углем наблюдали нормализацию фагоцитоза, приближавшуюся к показателям ложнооперированных крыс (фиг. 17-21).

Незначительное снижение среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции (СГИФ) наблюдалось после инкубации портальной венозной плазмы ПЖП и ПЖП+ЛПС крыс с нормальными нейтрофилами. Снижение СГИФ после лечения углем составляло от 1115 до 944 у ПЖП крыс и от 1104 до 998 у ПЖП+ЛПС крыс. У ПЖП крыс, получавших лечение углем, обнаруживали тенденцию к снижению портальной венозной концентрации ИЛ-4 и ИЛ-10. Уровни ФНО $\alpha$  и эндотоксинов, наблю-

даемые в крови воротной вены, были ниже в группе, получавшей лечение углем, хотя это не было статистически значимым. Различий между группами, получавшими лечение, и группами, не получавшими лечения, в уровнях экспрессии ТПР-4 и ТПР-2 в толстой кишке установлено не было.

Никакой разницы в относительной площади коллагеновых волокон между группой ПЖП, не получавшей лечения, и группой ПЖП+ЛПС найдено не было. Экспрессия актина гладкомышечных волокон в печени, которая, как обнаружили по данным иммуногистохимии, снижалась в группе ПЖП, получавшей лечение углем, и группе ПЖП+ЛПС, возможно объясняется механизмом уменьшения активации звездчатых клеток.

У животных, получавших лечение углем, нормализовалась проницаемость кишечника (фиг. 22).

Значительное увеличение сухой конечной массы тела наблюдали в группе ПЖП, получавшей лечение углем, ( $p=0,0271$ ) (фиг. 15). Гистология подвздошной кишки, тощей кишки и ободочной кишки после лечения углем осталась неизменной (фиг. 28).

Ожирение.

Воздействие пористых углеродных наночастиц на ожирение изучали на модели лептин-дефицитных Ob<sup>b</sup>/Ob<sup>b</sup> мышей. 10-14-недельные лептин-дефицитные мыши-самцы с генетическим ожирением получали терапию углем (0,04 г на 10 г массы тела в день). Мышей подвергали перфузии печени 5 мл охлажденного льдом ФСБ в воротную вену. Результаты получали путем выделения клеток Купфера и опеределения их характеристик при помощи метода проточной цитофлуориметрии (FACS анализа) без пермеабилзации клеток:

F4/80 (маркер клеток Купфера);

CD68 (маркер макрофагов);

CD11b (опосредует взаимодействие со стимулированным эндотелием, фагоцитоз, респираторный взрыв);

анализ продукции АФК (активные формы кислорода) ± ЛПС стимулировать;

исследование фагоцитоза.

Эксперименты с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД) и метионин-холин-дефицитной диетой (МХДД).

Влияние пористых углеродных частиц рассматривали на модели печеночного окислительного стресса с диетой, содержащей половинную норму метионина и холина (ЧМХДД) с целью изучения воспалительных и фиброзных компонентов НАЖБП. Уголь в составе ЧМХДД скармливали мышам со 2 недели диеты в дозе 0,4 г на 100 г массы тела в день. Полностью лишенную метионина и холина диету МХДД использовали для достижения запущенной стадии заболевания. Уголь в составе МХДД скармливали мышам с первого дня в 4-недельной модели в дозе 0,4 г на 100 г массы тела в день.

Проявление отдаленных последствий в органах.

Существенной разницы в почечной гистологии при обычном окрашивании (гематоксилином и эозином (Г&Э) и периодной кислотой или метенаминовым серебром (ПКМС)) отмечено не было. Экспрессия ТПР-4 в почках существенных отличий не имела. Креатинин сыворотки, как отражение функции почек, был ниже в группе ПЖП+ЛПС, получавшей лечение углем, но отличался незначительно (фиг. 30). Содержание воды в тканях мозга было ниже в группе ПЖП+ЛПС, получавшей лечение углем, но не являлось статистически значимым (фиг. 30). Никаких свидетельств эмболизации углем не наблюдалось ни на макроскопическом, ни на микроскопическом уровнях.

Обсуждение.

Мы демонстрируем *in vitro*, что микро/мезопористые угли имеют оптимальную пористость для того, чтобы связывать внутрипросветные факторы, имеющие отношение к патогенезу хронических заболеваний печени. Было показано их высокое сродство к свободному эндотоксину, однако без существенного влияния на кинетику роста бактерий. Таким образом, микро/мезопористые угли действуют как адсорбенты эндотоксина без антибиотических эффектов. Транслокация бактериальных продуктов при отсутствии жизнеспособных бактерий является известным явлением при циррозе. Клинические исследования показали, что культура-негативная бактериальная ПЦР-позитивность сыворотки и асцит являются прогностическим признаком выживания. У ПЖП крыс продемонстрировали транслокацию свободного внутрипросветного эндотоксина и показали, что она приводит к системной эндотоксемии, участвует в патогенезе обострения хронической печеночной недостаточности. Поэтому микро/мезопористые угли с их способностью связывать свободный эндотоксин, обладают потенциалом для уменьшения этого процесса. Кроме того, угли, не влияющие на кинетику роста бактерий, не могут быть ассоциированы с побочными эффектами, свойственными антибактериальной терапии. Они включают индуцированный антибиотиками дисбиоз со сдвигом синантропной флоры в направлении к резистентным бактериальным популяциям в кишечнике с потенциально пагубными последствиями. Кроме того, антибиотики приводят к образованию эндотоксинов и оказывают разнообразное воздействие на кинетику эндотоксина в зависимости от класса антибиотиков. Этот эффект не будет наблюдаться при терапии углем ввиду отсутствия антибиотической активности.

Известно, что эндотоксемия приводит к нарушению регуляции воспалительного ответа при циррозе. Данные *in vitro*, полученные в данном исследовании, подтверждают, что микро-мезопористые угли



имеют высокое сродство к цитокинам, отвечающим за развитие воспаления и потенциально имеющим отношение к патогенезу цирроза и обострению хронической печеночной недостаточности. Клинические исследования описывают связь портального венозного уровня цитокинов с нормальной историей болезни, включая портальный гемодинамический статус. Поэтому устранение при помощи угля портально-обусловленного ответа цитокинов обладает потенциалом для воздействия на портальную гипертензию.

Мы демонстрируем значительное снижение портального давления у ПЖП и ПЖП+ЛПС крыс после перорального введения микро/мезопористых углей. Наиболее заметное процентное снижение портального давления наблюдалось у ПЖП+ЛПС групп, получавших лечение. Это говорит о том, что уголь имеет заметное воздействие на чувствительность к эндотоксину у ПЖП животных, в частности, с учетом ответов портального давления. Терапия углем, однако, не оказала существенного влияния на среднее артериальное давление, а это позволяет предположить, что гемодинамические эффекты приурочены к портальной циркуляции.

Также наблюдали, что популяция клеток Купфера и ее функция модулируются при помощи лечения углем. Нормализацию популяции клеток Купфера в сторону такого уровня, как у ложнооперированных крыс, наблюдали у ПЖП крыс, получавших лечение углем, и ПЖП+ЛПС крыс. Наиболее паразитическим было значительное снижение ЛПС-индуцированной активности АФК клеток Купфера. Это говорит о том, что клетки Купфера у ПЖП крыс, получавших лечение углем, являются менее предрасположенными к последующей стимуляции эндотоксином.

С биохимической стороны этот вывод сопровождался значительным снижением аланин трансаминазы, что предпредлагает уменьшение АФК-индуцированного повреждения печени. Значительных отличий в абсолютных уровнях эндотоксина в портальной венозной плазме между получавшими и не получавшими лечение ПЖП животными не обнаружено. Одним из возможных объяснений незначительной разницы в содержании эндотоксина в портальной венозной крови может быть относительно низкая чувствительность LAL-теста. Структура липида А в эндотоксине обладает физиологической значимостью, которая однако не определяется с помощью LAL-теста. Поэтому существует возможность несоответствия между абсолютными значениями эндотоксина, обнаруженными при помощи анализа, и его физиологическими эффектами. LAL тест, как обнаружили, является особенно нечувствительным в определении эндотоксина, производимого синантропными членами семейства Enterobacteriaceae. Тот факт, что восприимчивость клеток Купфера к эндотоксину уменьшается, имеет большую значимость с физиологической точки зрения для терапии углем, которая приводит к нормализации популяции клеток Купфера и их функции.

Показатели кишечной проницаемости улучшались при приеме перорального угля, о чем свидетельствуют данные анализа лактулозы и рамнозы. Морфологических аномалий толстой кишки не наблюдалось (фиг. 28 и 22).

Была проведена оценка результатов анализа цитокинов и воздействия портальной венозной плазмы на респираторный взрыв нейтрофилов. Незначительное снижение остаточного респираторного взрыва наблюдали у нейтрофилов, инкубированных совместно с плазмой ПЖП крыс, получавших лечение углем, по сравнению с контролем, не получавшим лечения. Дисфункция нейтрофилов, как известно, опосредована гуморальным фактором и множество фактов свидетельствуют об участии эндотоксина в патогенезе. То, что усиленный респираторный взрыв обусловлен гуморальным фактором, явно подразумевает вовлеченность эндотоксина в патогенез. Также отмечалось снижение портальной венозной концентрации ИЛ-4 и ИЛ-10. ИЛ-4 участвовал в активации клеток Купфера, тогда как ИЛ-10 принимал участие в торможении ответа клеток Купфера в контексте метаболического пути адипонектина/интерлейкина-10/гемоксигеназы-1. Вряд ли является удивительным факт, что если уголь не является избирательным в связывании цитокина, то как провоспалительные, так и противовоспалительные ответы цитокинов уменьшаются одновременно. Фактически, у больных с обострением хронической печеночной недостаточности одновременно наблюдаются заметные провоспалительные и противовоспалительные ответы. Уменьшение обоих ответов в портальной циркуляции играет какую-то скрытую роль, не влияющую на системную иммунную функцию. В биологических системах, как это часто отмечается, существует значительная гетерогенность наблюдаемых величин, делающая тенденции незначимыми, и поэтому они требуют дополнительной оценки. (фиг. 23-26).

Хотя уголь не оказывает существенного воздействия на кинетику роста *E.coli* и *S.aureus* в исследованиях *in vitro* (фиг. 7 и 8), при последующей терапии углем *in vivo* была продемонстрирована модуляция популяций фекальных бактерий (фиг. 31-33). Заметное воздействие наблюдали на популяцию *Bacteroides*. Следовательно, уголь может влиять на кинетику роста бактериоидов, не относящихся к *E.coli* или влиять на состав кишечной микрофлоры путем связывания бактериальных метаболитов или других межклеточных сигнальных молекул.

У животных, получавших лечение углем, наблюдали уменьшение экспрессии гладкомышечного актина в печени. Это говорит о том, что воздействие лечения углем на следующие после нее процессы включает в себя модуляцию функции звездчатых клеток. Как было установлено, относительная площадь коллагеновых волокон в качестве меры фиброза, не имела значительных отличий при последующем лечении углем, возможно потому, что животные получали лечение только в течение последних двух не-

дель; однако снижение гладкомышечного актина показывает, что лечение углем может привести к уменьшению фиброза печени. Эти данные, взятые в совокупности, показывают, что воздействие угля на портальную гемодинамику опосредованы на синусоидальном уровне. Учитывая наблюдаемое воздействие на популяцию клеток Купфера и ее функцию, мы допускаем, что терапия микро/мезопористыми углями приводит к уменьшению транслокации бактериальных продуктов и снижению последующей воспалительной реакции, в результате чего уменьшилась восприимчивость клеток Купфера, продукция АФК и активация звездчатых клеток а, следовательно, фиброз.

Значительное улучшение параметров конечной массы тела наблюдали у крыс, получавших лечение углем по сравнению с ПЖП крысами, не получавшими лечение. Никакой существенной разницы конечной массы тела между ложнооперированными группами не наблюдали. Потеря массы при циррозе связана с состоянием повышенного катаболизма и снижением аппетита, особенно в контексте системного воспалительного ответа. Так как животные в этом эксперименте получали одинаковое кормление, а также в контексте вышеизложенных выводов, мы относим наблюдаемое улучшение в значениях массы на счет снижения катаболического статуса.

Терапия углем для перорального применения была связана со значительным снижением АЛТ с тенденцией к снижению веса у Ob/Ob<sup>-</sup> мышей, получавших лечение углем. АЛТ также была снижена в двух других моделях неалкогольной жировой болезни печени, а именно, при диете, содержащей половинную норму метионина и холина и метионин-холин-дефицитной диете. Это уменьшение повреждений было связано со снижением во всех 3 моделях накопления жира в печени и свидетельствовало об уменьшении воспалительного инфильтрата в этих 3 моделях. Такое уменьшение повреждений печени и накопления жира было ассоциировано с уменьшением тяжести фиброза и снижением маркеров фиброза на уровне экспрессии генов. Эти данные в совокупности показывают, что применение углей представляет собой эффективную терапию неалкогольной жировой болезни печени и уменьшает выраженность фиброза.

Механизм, посредством которого угли с контролируемой пористостью достигают этого, представляет собой модуляцию функции клеток Купфера. Лечение углем в моделях неалкогольной жировой болезни печени привело к модуляции фенотипа купферовских клеток, имеющей результатом снижение общей численности популяции клеток Купфера и CD11b (продуцирующих цитокин) клеток Купфера. У CD68<sup>+</sup> клеток Купфера обнаружили рост в отношении, как и фагоцитоза, так и количества АФК-продуцирующих клеток. Наблюдали значительное снижение ЛПС-индуцированной продукции АФК. (фиг. от 34 до 38).

Ухудшение функции почек, индуцирующееся у ПЖП животных введением ЛПС, было меньше у животных, получавших лечение углем, что указывает на его защитное действие в отношении почек. Уменьшение количества воды в тканях мозга у ПЖП+ЛПС животных, получавших лечение углем, предполагает возможность его применения в качестве средства для лечения печеночной энцефалопатии. Эти данные в совокупности указывают на возможную роль угля в качестве средства для профилактики обострения хронической печеночной недостаточности.

Заключение.

Активированные угли TE7/TE8 с микропорами и мезопорами/малыми макропорами быстро связывают *in vitro* эндотоксин и цитокины, отвечающие за развитие воспаления, не оказывая значительного воздействия на кинетику роста бактерий. Пероральное введение *in vivo* этих углей приводит к значительному снижению портального давления и биохимическим изменениям в печени, связанным со снижением популяции клеток Купфера и эндотоксин-индуцированной активности АФК. Это было связано с тенденцией к снижению ИЛ-4 и ИЛ-10. Никакой существенной разницы в окрашивании коллагена не наблюдалось, однако лечение углем было связано со снижением экспрессии гладкомышечного актина. Эти данные в совокупности показывают, что угли TE7/TE8 для перорального применения с микро/мезо/малыми макропорами модулируют портальную гемодинамику на синусоидальном уровне путем уменьшения транслокации бактериальных продуктов и последующий иммунный/воспалительный ответ.

Активированные угли TE7/TE8 с микропорами и мезопорами/малыми макропорами проявляют свойства, которые свидетельствуют о том, что они превосходят имеющиеся в настоящее время методы лечения. Диапазон пористости обеспечивает их превосходство над обычными микропористыми препаратами в отношении связывания биологически активных молекул, таких как эндотоксин и цитокины. Угли не проявляют антибиотической активности и, следовательно, не связаны с сопутствующим риском развития резистентности или последующего дисбиоза. Эти наблюдения позволяют предположить, что терапия углями TE7/TE8 для перорального применения с микропорами/мезопорами/малыми макропорами является многообещающей в качестве потенциальной безопасной и эффективной лечебной стратегии для снижения осложнений цирроза в виде специфической портальной гипертензии.

Пример 6. Воздействие терапии нанопористыми углеродными частицами для перорального применения на лептин-дефицитных мышей, использующихся в качестве модели неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

Методы.

Использовали мышей-самцов в возрасте 10-14 недель: 10 лептин-дефицитных *lep<sup>-</sup>/lep<sup>-</sup>* (Ob/Ob<sup>-</sup>) и 10 гетерозиготных мышей-самцов рандомизировали для получения порошкообразного корма ± уголь (TE7;

0,4 г на 100 г массы тела в день) в течение 4 недель (дикий тип - n=3; Ob<sup>-</sup> гетерозиготные - n=5; Ob<sup>-</sup> гетерозиготные + уголь - n=5; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup> нелеченные - n=5; Ob<sup>-</sup>/Ob<sup>-</sup> + уголь - n=5). Степень поражения печени оценивали по уровню АЛТ в сыворотке. Кроме того, выделяли непаренхиматозные клетки и популяцию клеток Купфера (КК) характеризовали при помощи проточной цитометрии, как клетки, экспрессирующие F4/80 (маркер клеток Купфера), CD68 (маркер макрофагов) и CD11b (опосредует взаимодействие со стимулированным эндотелием, фагоцитоз, респираторный взрыв). Также анализировали продукцию активных форм кислорода (АФК) изолированными КК. Экспрессию в печени ТПП-4 как суррогата эндотоксемии определяли с помощью иммуногистохимии.

#### Результаты.

Лечение или профилактика углем для перорального применения у Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей были связаны со значительным снижением концентрации АЛТ с  $889 \pm 280$  МЕ/мл до  $408 \pm 42$  МЕ/мл ( $p < 0,05$ ). В общей численности популяции КС у Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей, которая, как обнаружили, была повышена по сравнению с гетерозиготным контролем, наблюдалось значительное снижение при лечении или профилактике углем ( $p < 0,05$ ). Также наблюдали значительное снижение продукции АФК клетками Купера у Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей, получавших лечение углем ( $p < 0,05$ ) по сравнению с Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> контролем, не получавшим лечение. У группы Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей также наблюдали значительное снижение численности субпопуляции F4/80<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> клеток при лечении или профилактике углем ( $p < 0,05$ ). Кроме того, у Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей, получавших лечение углем, снижалась экспрессия в печени ТПП-4 по сравнению с контролем, не получавшим лечения. Наконец, мы наблюдали тенденцию к снижению конечной массы тела у Iер<sup>-</sup>/Iер<sup>-</sup> мышей, получавших лечение углем, по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения ( $p = 0,095$ ).

#### Заключение.

Частицы микро/мезопористых углей TE7/TE8 для перорального применения могут быть новым способом терапии неалкогольной жировой болезни печени за счет модулирования эндотоксемии и функции клеток Купфера (КС).

#### Пример 7. Удаление ацетальдегида.

На фиг. 5 показано удаление ацетальдегида в зависимости от времени. Ацетальдегид является весьма реакционноспособным, поэтому использовали ДИГ как дериватирующий агент в соответствии с методом Rideout. Последний образует стабильное производное азина, обнаруживаемое по флуоресценции при 430 нм.

Пример 8. Воздействие терапии нанопористыми углеродными частицами для перорального применения на мышей, получавших диету, содержащую половинную норму метионина и холина (ЧМХДД), и использующихся в качестве модели неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

#### Методы.

10 мышей самцов в возрасте 10-14 недель содержали на метионин-холин-дефицитной диете (ЧМХДД; 4 недели); 10 мышам скармливали контрольную диету (4 недели). В каждой из групп животные были рандомизированы для получения порошкообразного корма  $\pm$  уголь (TE7; 0,4 г на 100 г массы тела в день) в течение 2 недель. Степень поражения печени оценивали по уровню АЛТ в сыворотке и гистологическому окрашиванию гематоксилином и эозином. Тяжесть фиброза устанавливали с использованием окрашивания красителем Sirius red. В ткани печени измеряли экспрессию генов маркеров фиброза, коллагена 1 A2 и TGF- $\beta$ .

#### Результаты.

Лечение углем приводило к норме уровни АЛТ и заметно снижало стеатоз печени и воспалительную клеточную инфильтрацию у мышей ЧМХДД. Это было связано со значительным уменьшением фиброза. У животных, получавших лечение углем, экспрессия генов коллагена 1A2 и TGF- $\beta$  была значительно снижена (фиг. 39-43).

#### Заключение.

Частицы микро/мезопористых углей TE7/TE8 для перорального применения могут быть новым способом терапии неалкогольной жировой болезни печени.

Пример 9. Воздействие терапии нанопористыми углеродными частицами для перорального применения на мышей, получавших метионин-холин-дефицитную диету (МХДД), которые используются в качестве модели неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

#### Методы.

10 мышей самцов в возрасте 10-14 недель содержали на метионин-холин-дефицитной диете (МХДД; 4 недели); 10 мышам скармливали контрольную диету (4 недели). В каждой из групп животные были рандомизированы для получения порошкообразного корма  $\pm$  уголь (TE7; 0,4 г на 100 г массы тела в день) в течение 2 недель. Степень поражения печени оценивали по уровню АЛТ в сыворотке и гистологическому окрашиванию гематоксилином и эозином. Тяжесть фиброза устанавливали с использованием окрашивания красителем Sirius red.

#### Результаты.

Лечение углем приводило к норме уровни АЛТ и заметно снижало стеатоз печени и воспалительную клеточную инфильтрацию у мышей МХДД. Это было связано со значительным уменьшением фиб-

роза (фиг. 44-46).

Заключение.

Частицы микро/мезопористых углей TE7/TE8 для перорального применения могут быть новым способом терапии неалкогольной жировой болезни печени за счет модулирования эндотоксемии и функции клеток Купфера (КС).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пористых углеродных частиц при производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний печени, где от 20 до 90% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм, где указанные частицы приготовлены для перорального или ректального введения и где пористость измерена с помощью ртутной порометрии и/или газосорбционного анализа.

2. Применение по п.1, где 85% или более оставшегося общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм.

3. Применение по п.2, где 90% или более оставшегося общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм.

4. Применение по любому из пп.1-3, где 75% или более, 85% или более или 90% или более оставшегося общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр от 50 до 300 нм.

5. Применение по любому из пп.1-4, где 75% или более, 85% или более или 90% или более оставшегося общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр от 50 до 200 нм.

6. Применение по любому из пп.1-5, где от 35 до 60% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее.

7. Применение по любому из пп.1-6, где от 45 до 55% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее.

8. Применение по любому из пп.1-7, где общий объем пор указанных частиц составляет от 0,5 до 2,5 см<sup>3</sup>/г.

9. Применение по любому из пп.1-8, где общий объем пор указанных частиц составляет от 1,0 до 2,0 см<sup>3</sup>/г.

10. Применение по любому из пп.1-9, где объемная плотность пористых углеродных частиц составляет от 0,10 до 0,30 г/см<sup>3</sup>.

11. Применение по любому из пп.1-10, где объемная плотность пористых углеродных частиц составляет от 0,15 до 0,25 г/см<sup>3</sup>.

12. Применение по любому из пп.1-11, где удельная площадь поверхности указанных частиц, измеренная методом БЭТ (Брунауэр, Эммет, Теллер), составляет от 700 до 2000 м<sup>2</sup>/г.

13. Применение по любому из пп.1-12, где удельная площадь поверхности указанных частиц, измеренная методом БЭТ (Брунауэр, Эммет, Теллер), составляет от 900 до 1400 м<sup>2</sup>/г.

14. Применение по любому из пп.1-13, где частицы имеют сферическую форму.

15. Применение по любому из пп.1-14, где частицы приготовлены для перорального введения в свободнотекущей форме или в форме таблеток.

16. Применение по любому из пп.1-15, где частицы покрыты для контроля высвобождения из них в толстой кишке.

17. Применение по любому из пп.1-16, где заболевание печени выбрано из алкогольной болезни печени (АБП), неалкогольной болезни печени, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), цирроза и/или осложнений цирроза.

18. Применение по п.17, где неалкогольная болезнь печени является неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП).

19. Применение по любому из пп.1-16 при лечении или профилактике воспаления и фиброза при хронических заболеваниях печени, таких как АБП, НАЖБП или вирусный гепатит.

20. Применение по п.17, где осложнение цирроза выбрано из портальной гипертензии, асцита, почечной недостаточности, печеночной энцефалопатии и обострения хронической печеночной недостаточности.

21. Способ лечения или профилактики заболевания печени, включающий введение эффективного количества пористых углеродных частиц, как определены в любом из пп.1-16.

22. Способ по п.21, где заболевание печени представляет собой заболевание, указанное в любом из пп.17-20.

23. Применение пористых углеродных частиц, как определены в любом из пп.1-16, при производстве лекарственного средства для модуляции функциональной оси "кишечник-печень".

24. Применение по п.23, где модуляция функциональной оси "кишечник-печень" осуществляется путем модуляции кишечного дисбиоза, или ожирения, или повышенной проницаемости кишечника.

25. Способ модуляции функциональной оси "кишечник-печень", включающий введение эффектив-

ного количества пористых углеродных частиц, как определены в любом из пп.1-16.

26. Способ по п.25, где модуляция функциональной оси "кишечник-печень" осуществляется путем модуляции кишечного дисбиоза, или ожирения, или повышенной проницаемости кишечника.

27. Лекарственная форма для лечения или профилактики заболеваний печени, содержащая пористые углеродные частицы и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель,

где от 20 до 90% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм; и

где пористость измерена с помощью ртутной порометрии и/или газсорбционного анализа, где указанная лекарственная форма предназначена для перорального или ректального введения.

28. Лекарственная форма по п.27, где заболевание печени представляет собой заболевание, указанное в любом из пп.17-20.

29. Лекарственная форма для модуляции функциональной оси "кишечник-печень", содержащая пористые углеродные частицы и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель,

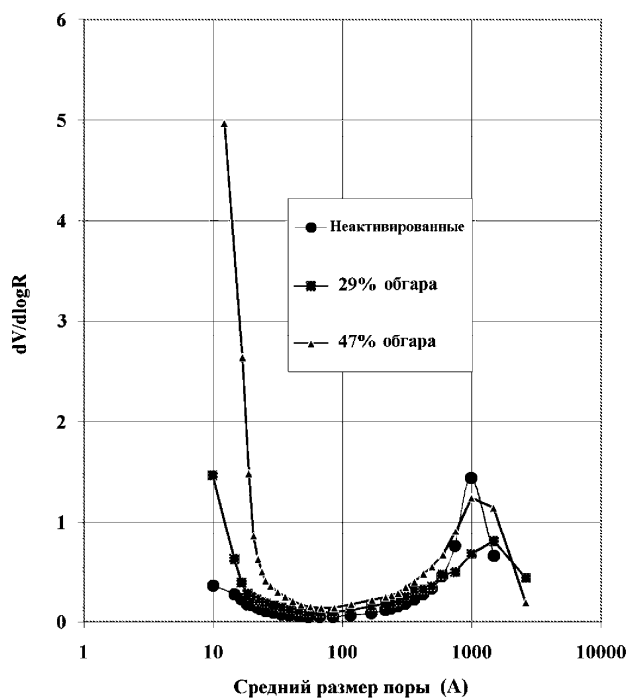
где от 20 до 90% общего объема пор указанных частиц составляют поры, имеющие средний диаметр 2 нм или менее, а 75% или более оставшегося общего объема пор составляют поры, имеющие средний диаметр от 30 до 500 нм; и

где пористость измерена с помощью ртутной порометрии и/или газсорбционного анализа, где указанная лекарственная форма предназначена для перорального или ректального введения.

30. Лекарственная форма по п.29 для модуляции функциональной оси "кишечник-печень" путем модуляции кишечного дисбиоза, или ожирения, или повышенной проницаемости кишечника.

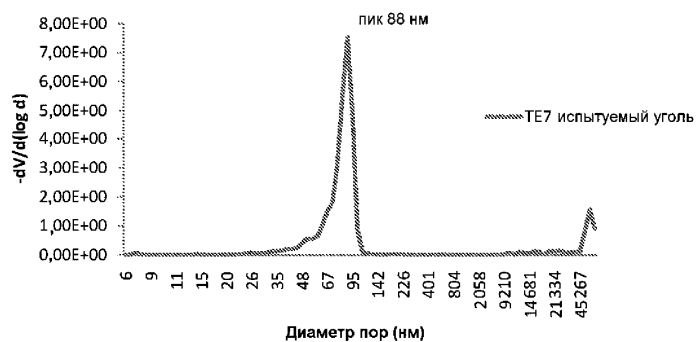
31. Лекарственная форма по любому из пп.27-30, где пористые углеродные частицы имеют признаки, указанные в любом из пп.2-16.

Распределение размеров пор, измеренное по адсорбции азота  $N_2$

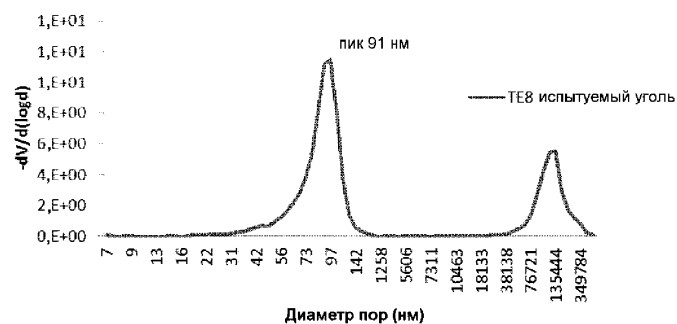


Фиг. 1

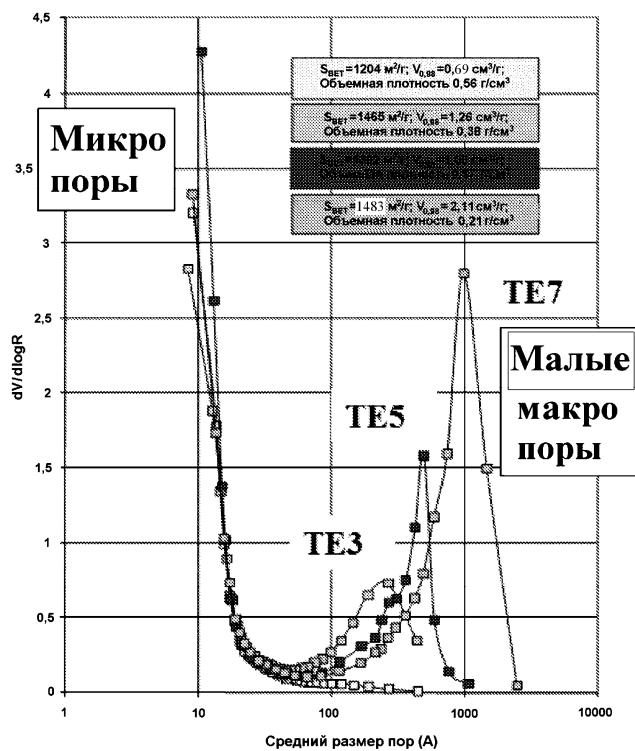
**A** **Распределение размеров пор, измеренное методом ртутной порометрии**



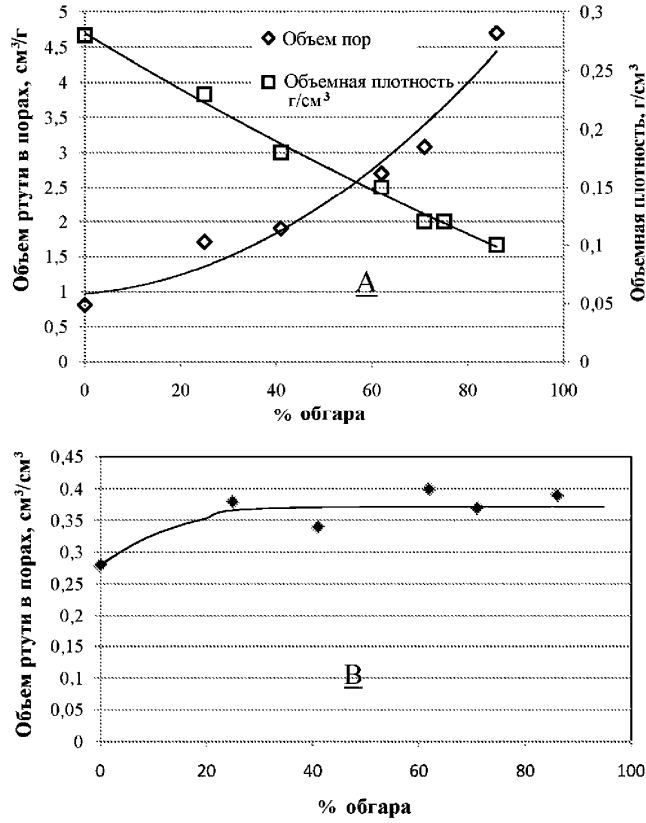
**B** **Распределение размеров пор, измеренное методом ртутной порометрии**



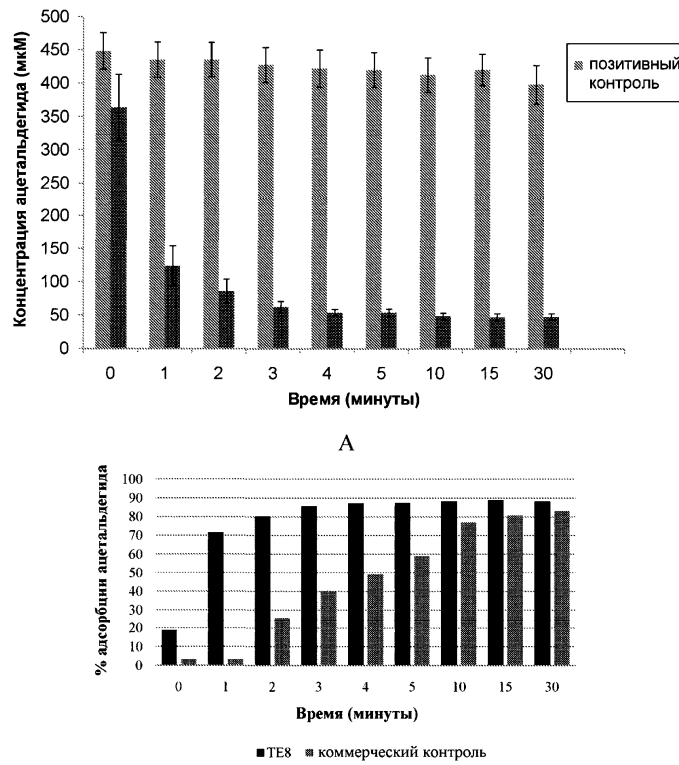
Фиг. 2



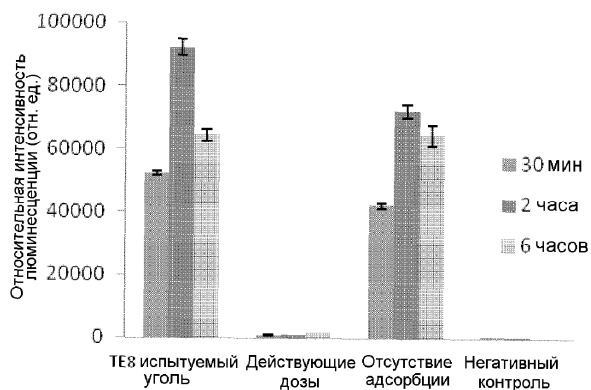
Фиг. 3



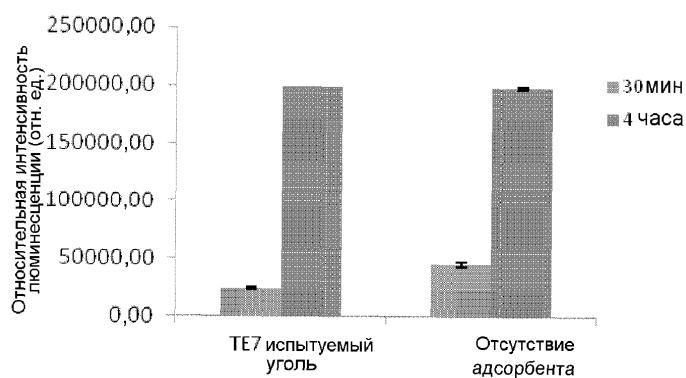
Фиг. 4



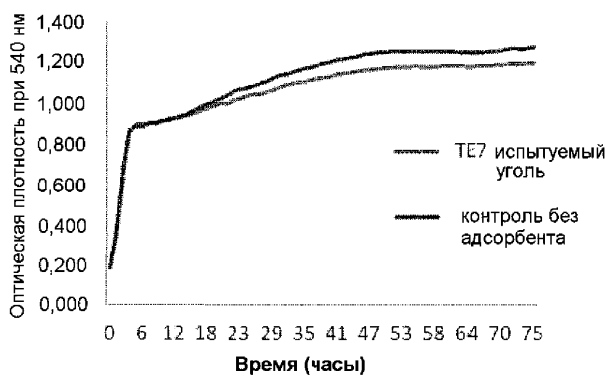
Фиг. 5



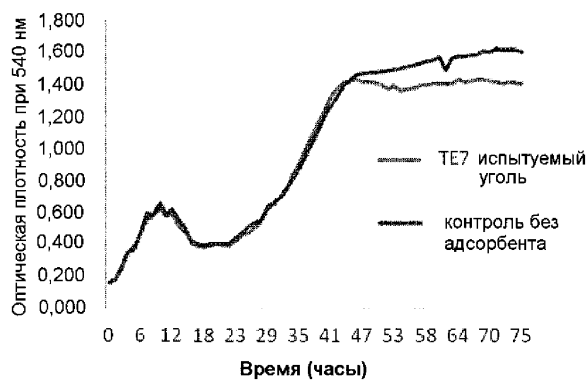
Фиг. 6



Фиг. 7

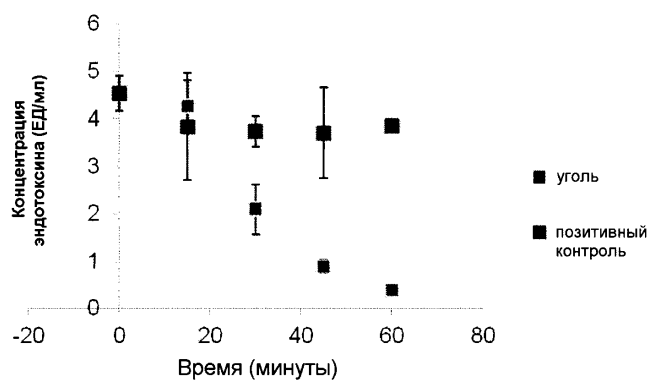


Фиг. 8

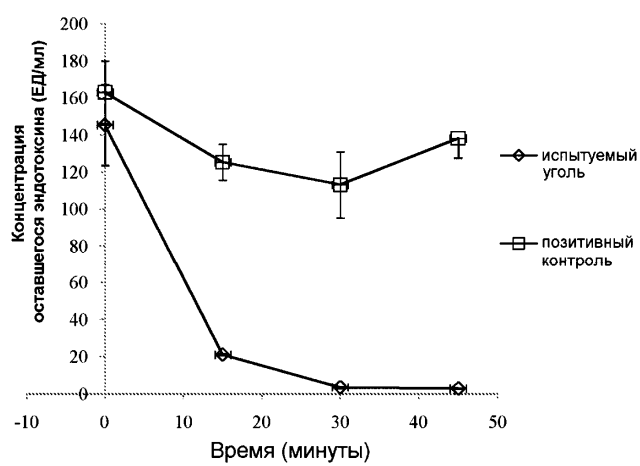


Фиг. 9



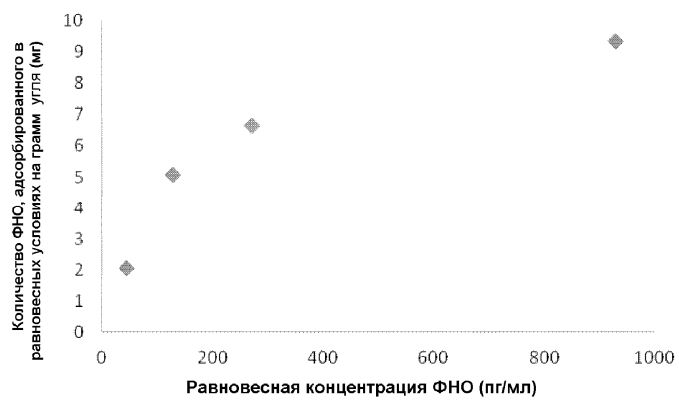


А

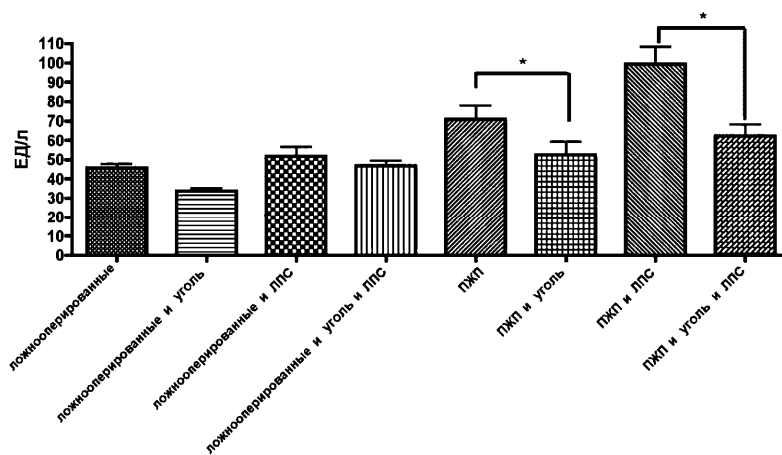


В

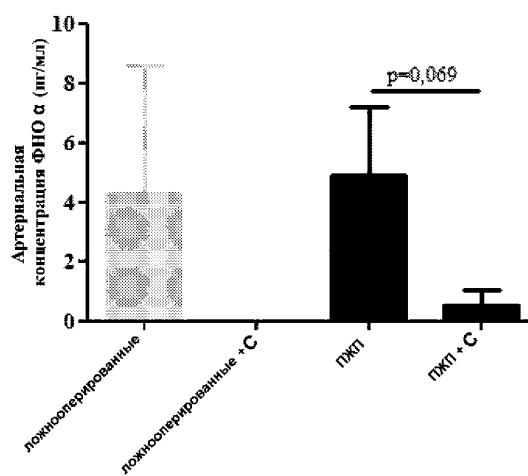
Фиг. 10



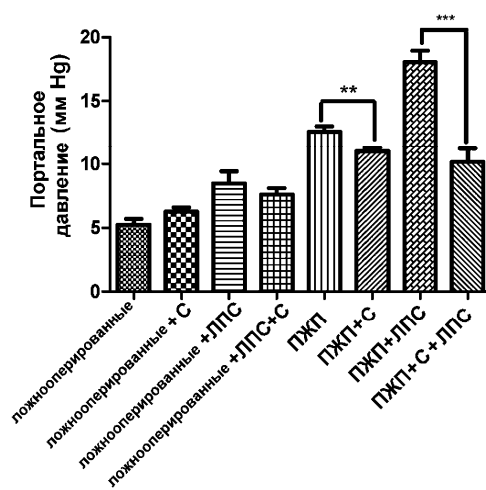
Фиг. 11



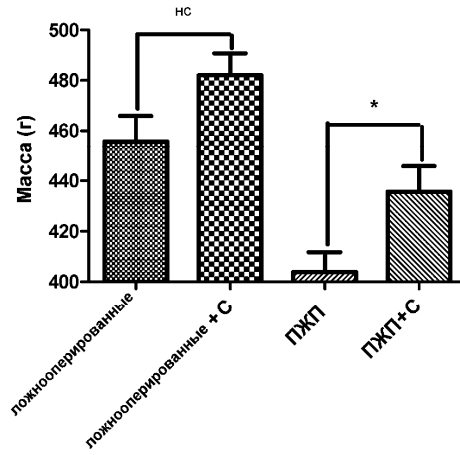
Фиг. 12



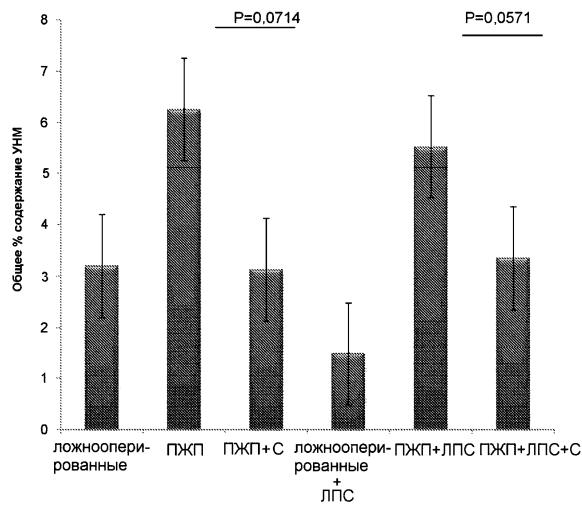
Фиг. 13



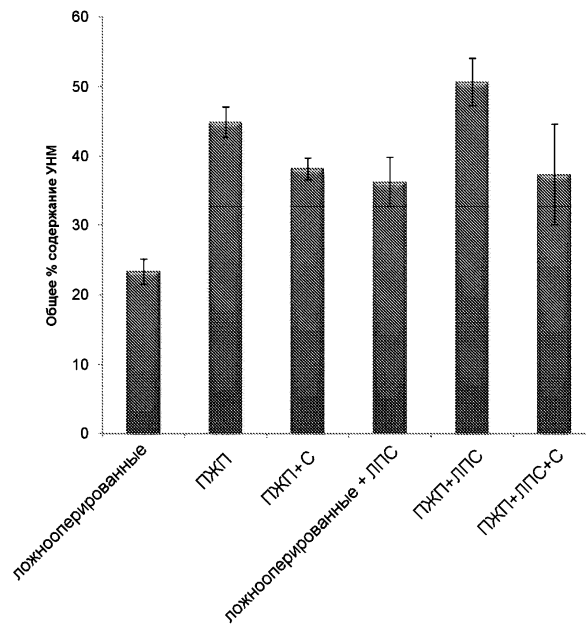
Фиг. 14



Фиг. 15

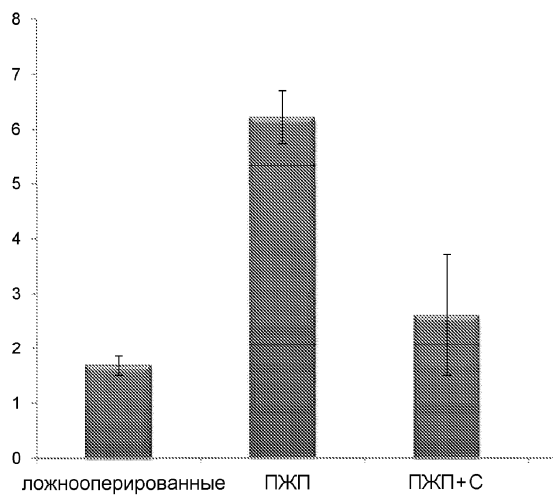


Фиг. 16

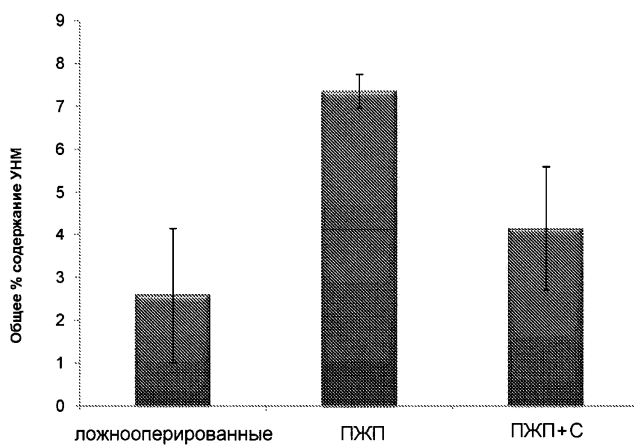


Фиг. 17

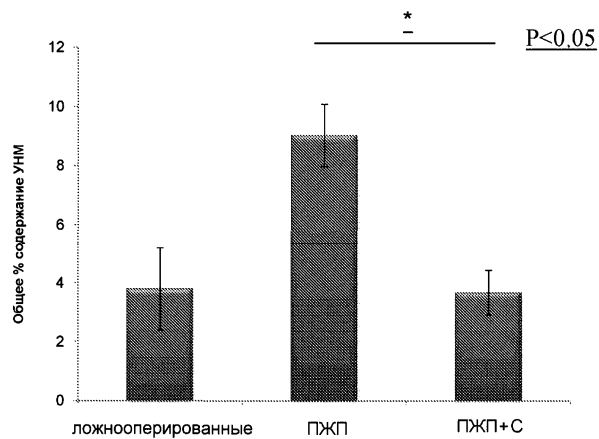
038965



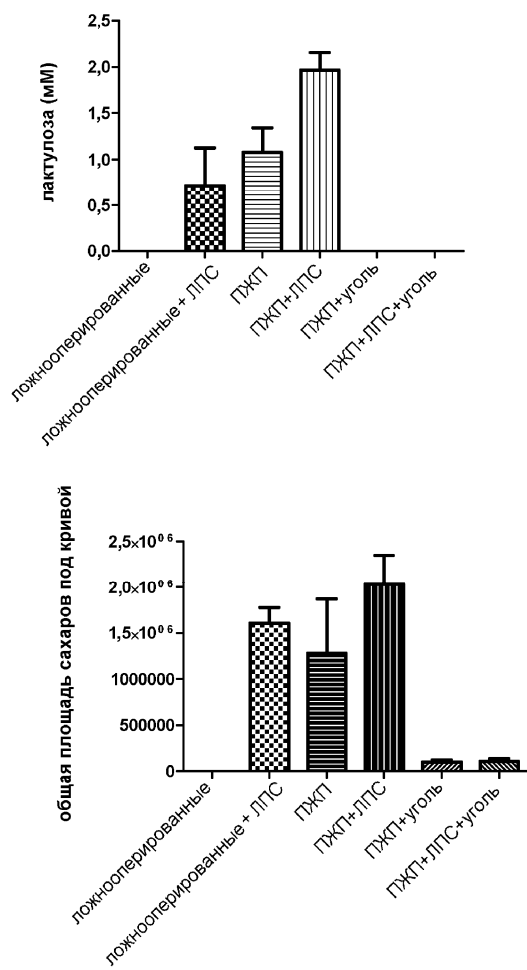
Фиг. 18



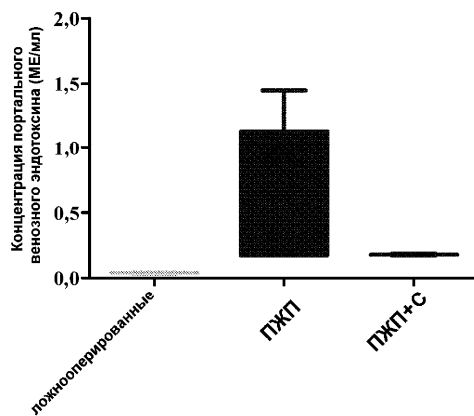
Фиг. 19



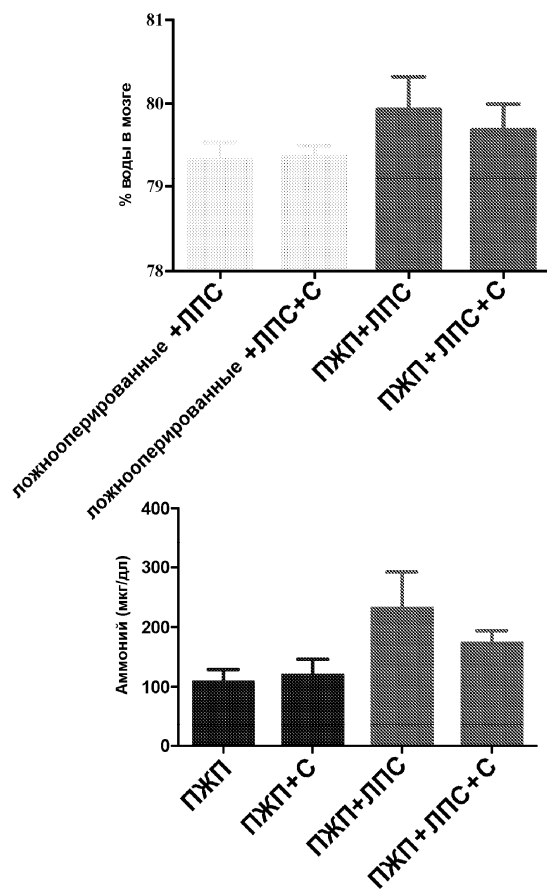
Фиг. 20



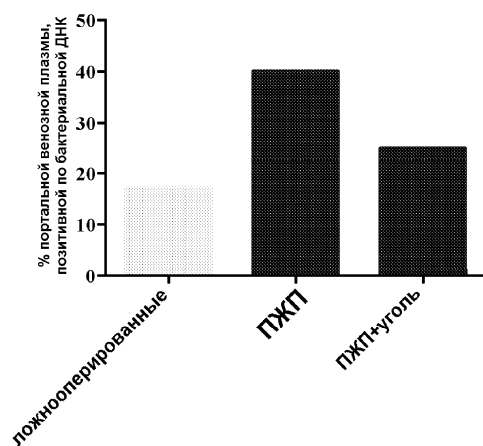
Фиг. 21



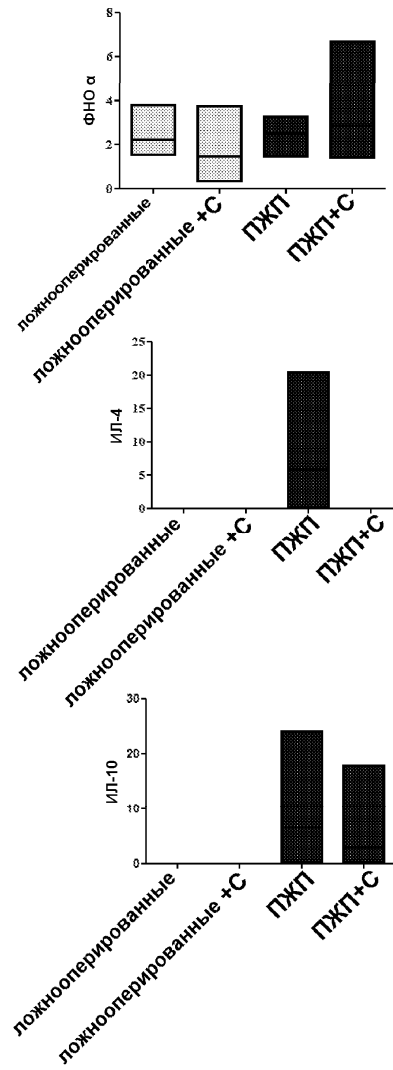
Фиг. 22



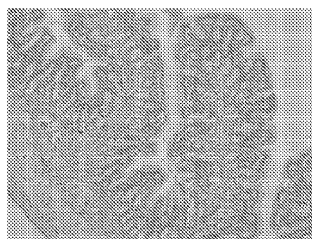
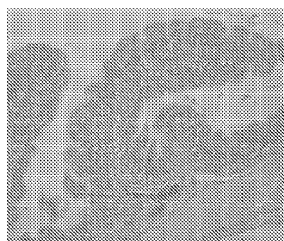
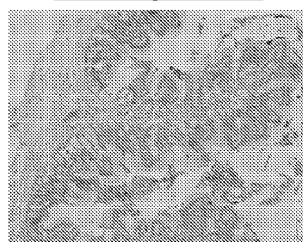
Фиг. 23



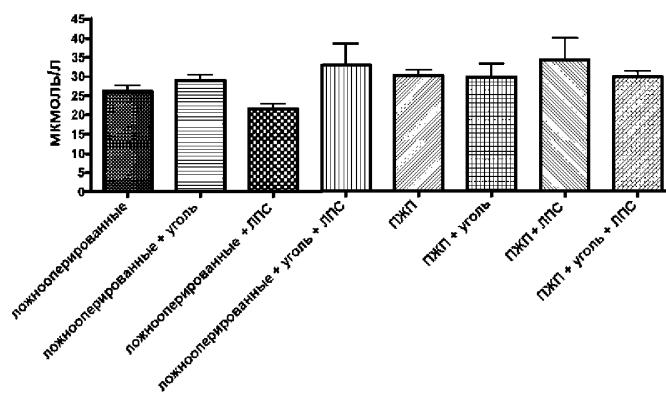
Фиг. 24



Фиг. 25

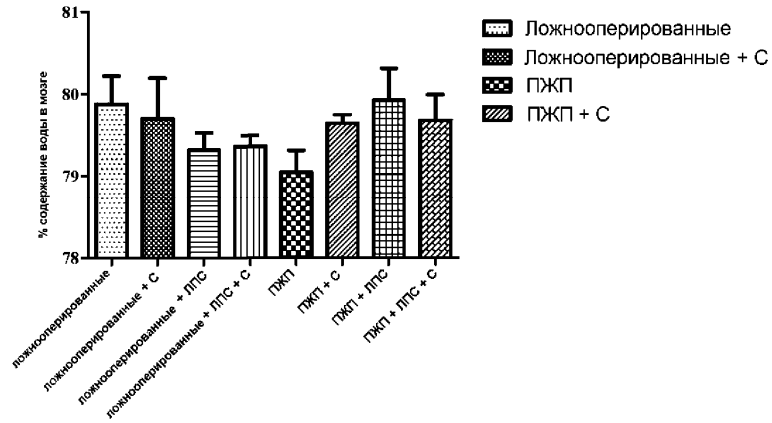
**Ложнооперированные****ПЖП****ПЖП + уголь**

Фиг. 26

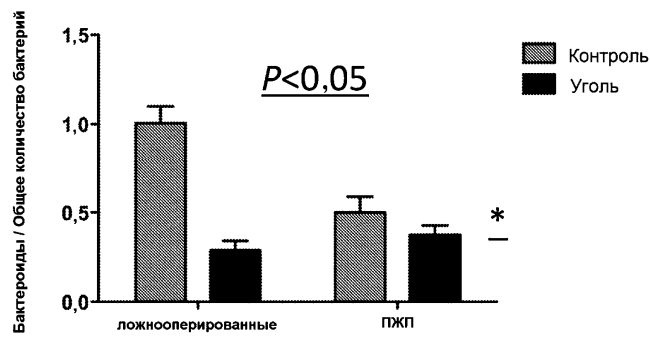


Фиг. 27



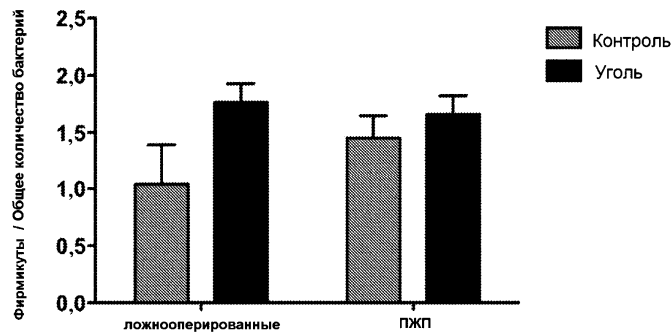


Фиг. 28

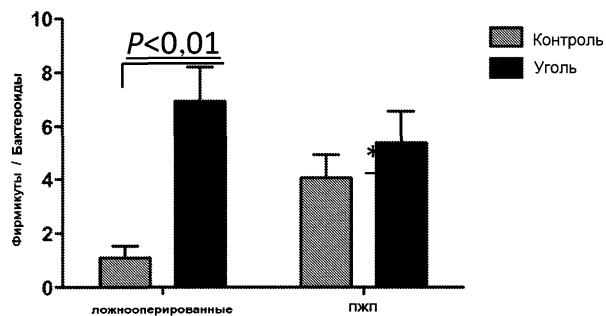


\*P<0,05 по сравнению с ложнооперированными

Фиг. 29

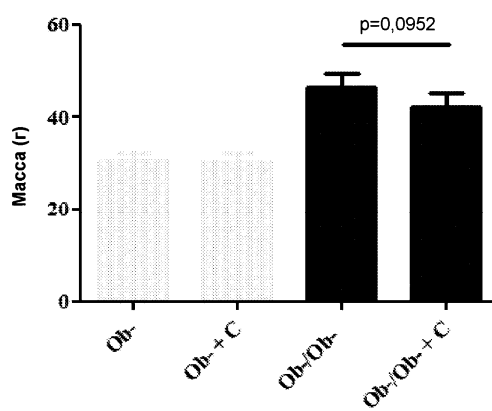


Фиг. 30

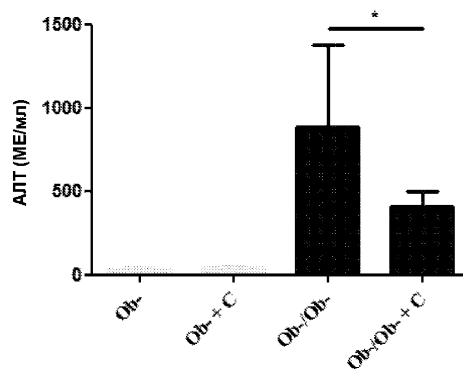


\* $P < 0,05$  по сравнению с ложнооперированными

Фиг. 31

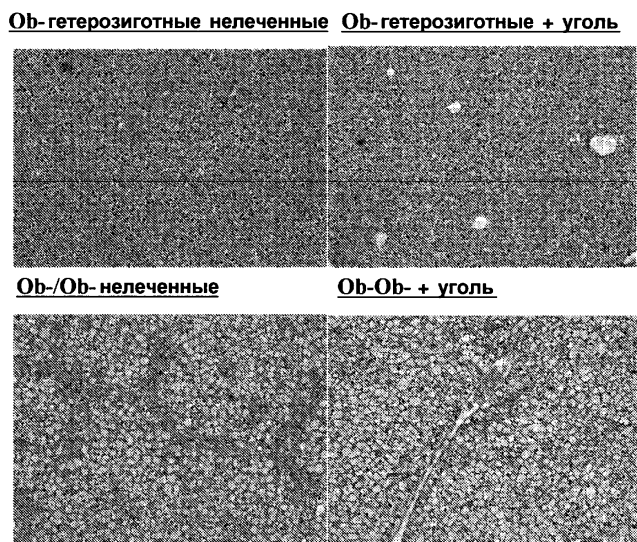


Фиг. 32

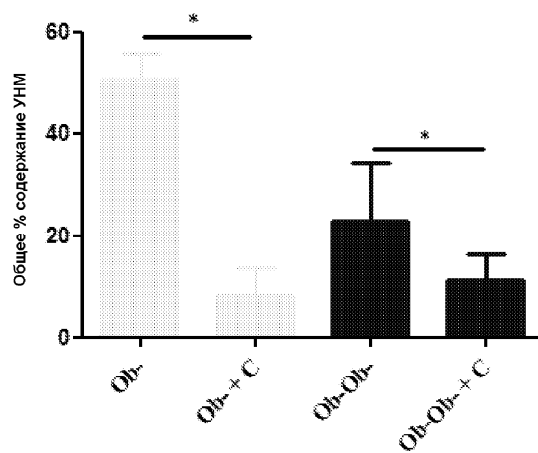


ObOb=889+280  
ObOb+C=408+42

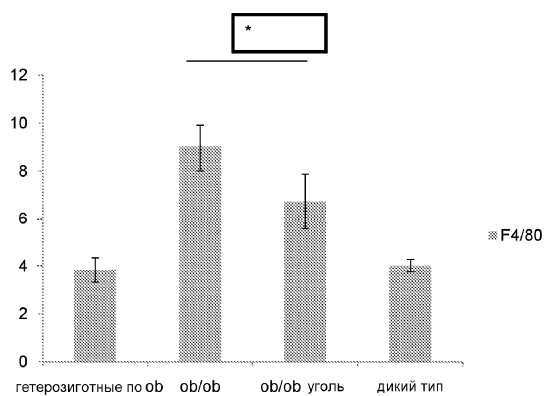
Фиг. 33



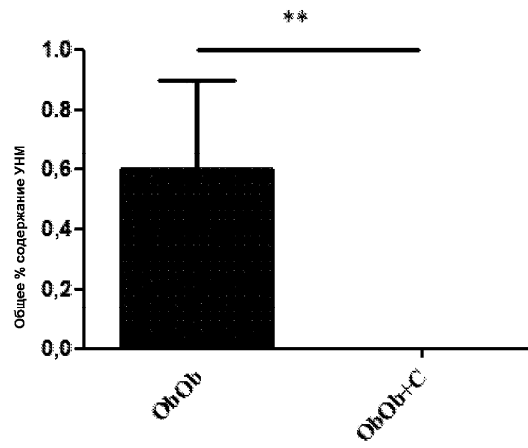
Фиг. 34



Фиг. 35

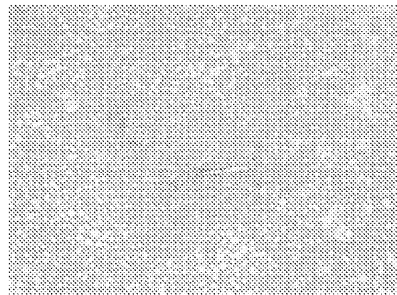


Фиг. 36

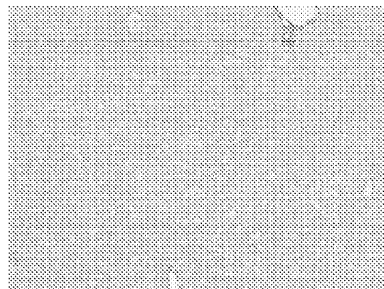


Фиг. 37

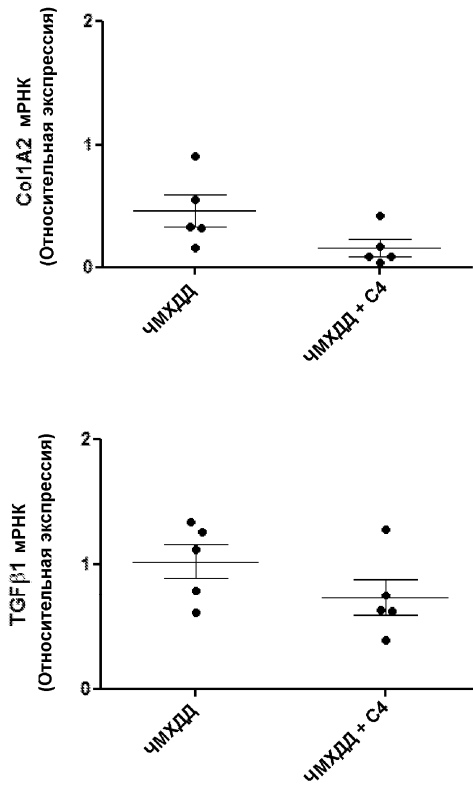
**ЧМХДД нелеченные**



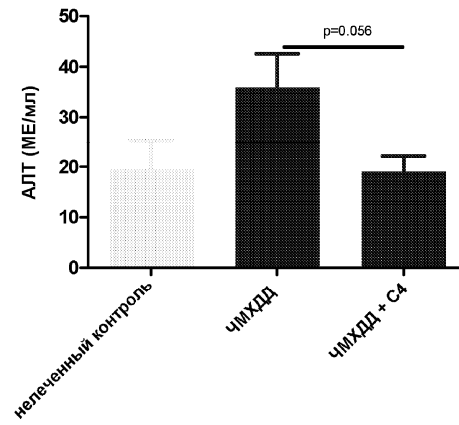
**ЧМХДД + уголь**



Фиг. 38

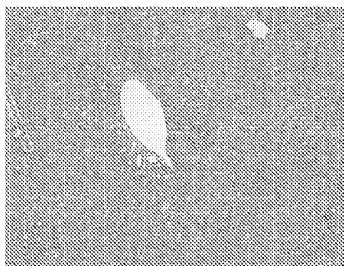


Фиг. 39

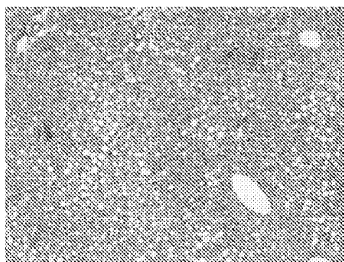


Фиг. 40

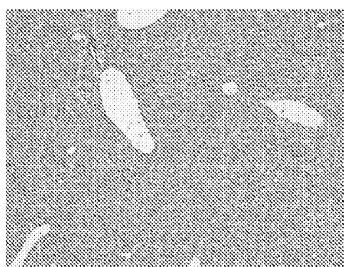
**Ложнооперированные**



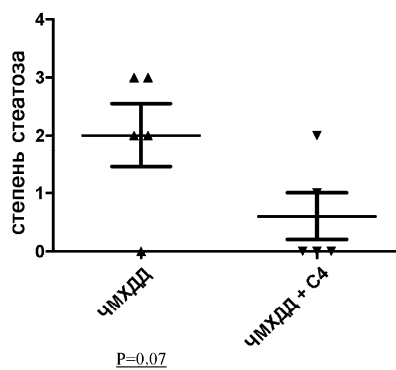
**ЧМХДД нелеченные**



**ЧМХДД + уголь**

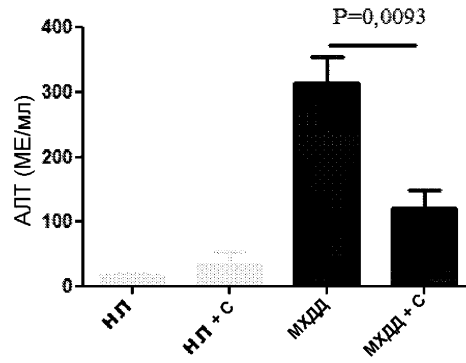


Фиг. 41



**Степень стеатоза**

Фиг. 42

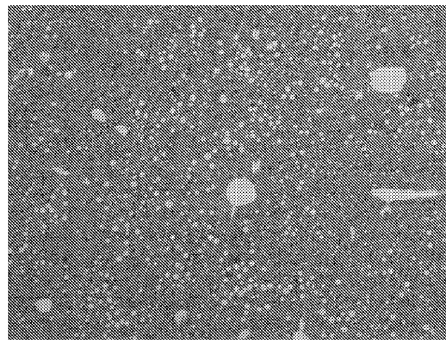


Средняя концентрация  
АЛТ (МЕ/мл)

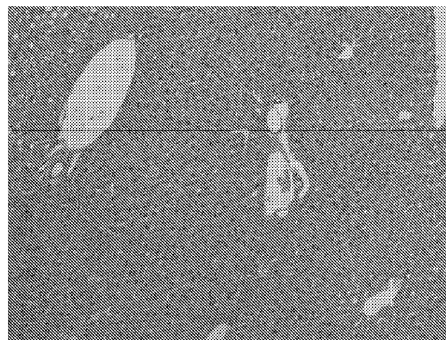
$\frac{\text{МХДД}}{\text{МХДД} + \text{С}} = \frac{314+39}{120+29}$

Фиг. 43

МХДД нелеченные

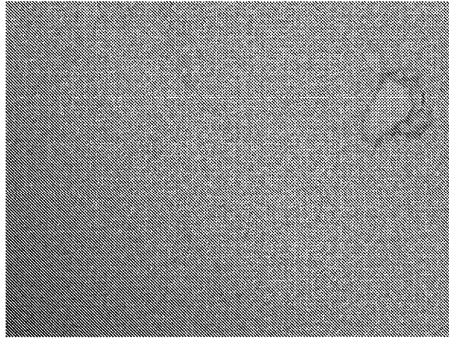


МХДД + уголь

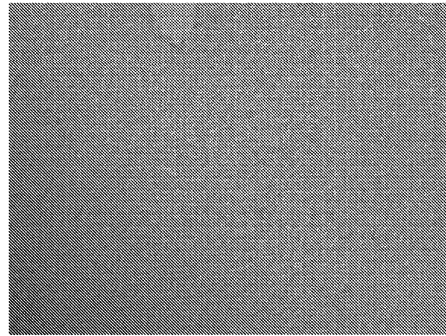


Фиг. 44

МХДД нелеченные



МХДД + уголь



Фиг. 45

