

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044367**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.21

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)

(21) Номер заявки
202291379

(22) Дата подачи заявки
2017.05.03

(54) **ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ БЕНЗОДИАЗЕПИНА С АКТИВНОСТЬЮ НА НЕВРОПАТИЧЕСКУЮ БОЛЬ**

(31) **2016-0058**

(56) CU-B1-238791
WO-A2-2009137462

(32) **2016.05.04**

(33) **CU**

(43) **2022.07.28**

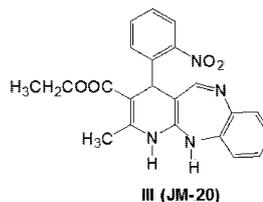
(62) **201892461; 2017.05.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИДАД ДЕ ЛА
ГАВАНА; СЕНТРО ДЕ
ИНВЕСТИГАСИОН И ДЕСАРРОЛЬО
ДЕ МЕДИКАМЕНТОС СИДЕМ (CU)**

(72) Изобретатель:
**Нунез Фигуэредо Яниэр, Вонг Гуерра
Майлин, Фонзека Фонзека Луис
Артуро, Гарридо Суарез Барбара
Беатрис, Рамирез Санчез Дженей,
Пардо Андреу Гилберто Лазаро,
Вердеция Рейес Ямила, Очоа
Родригуес Эстаел, Барзага Фернандес
Педро Жильберто, Гонзалез Алфонсо
Никте, Делгадо Хернандез Рене,
Падрон Якис Алехандро Саул (CU)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(57) Соединение формулы III, его продукты и фармацевтические композиции, содержащие их, для лечения заболеваний центральной нервной и сосудистой систем, в частности невропатической боли, а также патологических процессов, связанных со старением.



044367
B1

044367
B1

Область техники

Изобретение относится к профилактике и/или лечению невропатической боли.

При этом сценарии стратегии лечения должны препятствовать обеим системам при помощи комбинации ингибитора фермента AChE, способного улучшать холинергический тонус, с антагонистом рецептора NMDA, способным сопротивляться индуцированной глутаматом нейродегенерации. Тем не менее, эта комбинация терапий имеет несколько недостатков. Помимо противостояния введению отдельных лекарственных средств, создается дополнительная проблема для пациентов старшего возраста, страдающих от AD, и для людей, которые ухаживают за ними, заключающаяся в том, что различные фармакокинетики соответствующих лекарственных средств могут иметь различную фармакодинамику. На практике, больницы не будут приветствовать комбинированную терапию двумя различными кривыми ADME (введение, распределение, метаболизм и выделение).

Альтернативный и новый подход к комбинации двух медикаментов заключается в двух лекарственных средствах, которые могут воздействовать на множество фармакологических мишеней, так называемых многоцелевых лекарственных средствах (MTD).

Стратегия воздействия на два или более белков одновременно простым соединением может обеспечивать превосходные терапевтические эффекты (Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatto V, Recanatini M, Melchiorre C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases *J Med Chem* 2008, 51, 347-72) (Zimmerman GR, Lehar J, Keith CT. Multi-target therapeutics; when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today* 2007, 12, 34-42) (Morphy R, Ranlovic, Z. Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discov Today* 2007, 12, 156-60). Это можно объяснить рядом потенциальных выгод, обеспечиваемых использованием MTD относительно коктейлей или многокомпонентных медикаментов. Преимущества MTD относительно коктейлей можно подытожить следующим образом: 1) снижение изменчивости клинического развития, при условии, что прогнозирование фармакокинетики простого соединения намного проще, чем для коктейля, преодолевая проблему различных биодоступностей, фармакокинетики и метаболизма; 2) безопасность фармакодинамики; 3) повышенная эффективность ввиду синергического эффекта ингибирования множества терапевтических мишеней, и 4) повышенная безопасность при снижении вторичных эффектов потребления коктейлей лекарственных средств (снижение рисков ввиду взаимодействий лекарственное средство-лекарственное средство); это особенно характерно для метаболизма лекарственных средств, где конкуренция различных лекарственных средств для такого же метаболического фермента влияет на их токсичность.

Другим важным преимуществом является упрощенный терапевтический режим с улучшенными возможностями комплаенса, и это особенно важно для пациентов с болезнью Альцгеймера старшего возраста и их опекунов (Small, G, Dubois B A review of compliance to treatment in Alzheimer's disease: potential benefits of a transdermal patch. *Curr Med Res Opin* 2007, 23, 2705-13). В этом отношении важным аспектом является то, что пациенты с болезнью Альцгеймера подвержены широкому диапазону медицинских состояний (сопутствующим заболеваниям), которые включают гипертонию, сосудистые заболевания и диабет, которые часто могут быть сопутствующими. Таким образом, проблемы, связанные с использованием нескольких фармацевтических средств для населения старческого возраста, были признаны критическими в последние годы. Эти проблемы главным образом заключаются во взаимодействии лекарственных средств, что происходит чаще у этой части населения ввиду сосуществования хронических заболеваний и отказов органов. Нельзя предположить, что два лекарственных средства, которые сами по себе являются безопасными, будут также безопасны при объединении, особенно у населения преклонного возраста. Кроме того, ряд лекарственных средств, вводимых одновременно, должен быть снижен настолько, насколько это возможно, поскольку пожилой возраст является непредсказуемым фактором риска для любого лечения лекарственными средствами (Turnheim, K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp. Geront.* 2006, 38, 843-853). Поскольку MTD являются особенно предпочтительными относительно комплексных терапий в отношении сложности взаимодействий между многофункциональными лекарственными средствами, сопутствующими заболеваниями, измененными чувствительностями к фармакодинамике и изменениями фармакокинетики у людей пожилого возраста. Клиническое использование MTD может также упростить терапевтический режим (Youdim, M.B., and Buccafusco, JJ (2005) CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases *J. Neural Transm* 112, 519-537). Комплаенс с предписанными режимами приема лекарств важен для эффективного лечения.

Множество эпидемиологических исследований показали, что широко распространена хроническая боль, серьезно влияя на здоровье людей, здравоохранение и социальные услуги (Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006; 7:281-289) (Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Redefinition of neuropathic pain and a grading system for clinical use: consensus statement on clinical and research diagnostic criteria. *Neurology* 2008; 70:1630-1635). В частности, было оценено, что хроническая боль с невропатическим содержанием влияет приблизительно на 7-8% всего населения, а терапии, доступные для их лечения, все еще неудовлетворительны (Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuro-

pathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006; 7:281-289) (van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 2014; 155:654-62) (Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. *Pain* 2012; 153:359-365). NP рассматривается как симптом нейродегенерации, следовательно, логично рассмотреть нейропротективное действие как стратегию предотвращения его начала, борьбы с прогрессированием и даже возврата нервных повреждений, приводящих к этим симптомам хронической боли (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662). Нейропротективное действие включает способы, которые поддерживают выживаемость нейронов или их работу в контексте патологического стресса (травматических, токсических, ишемических или метаболических событий). Таким образом, на сегодняшний день лечение большинства невропатий периферической и центральной NP (болезненная диабетическая невропатия, дистальная полинейропатия, сенсорная дистальная, обусловленная ВИЧ, и антиретровирусная терапии, периферические невропатии, вызванные химиотерапией, постгерпетическая невралгия, боль MS и боль после инсульта и т.д.) направлены на эту область (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (Flatters SJL, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 2006; 122: 245-257) (Jaggi AS, Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drug-induced peripheral neuropathy. *Toxicology* 2012; 291 :1-9). Особое внимание уделяется глутаматергической дисфункции, нитро-окислительному стрессу, митохондриальной дисфункции, апоптозу, трофическим факторам, нейровоспалению и изменениям в неповрежденных волокнах, вызванным нейродегенерацией (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (DeLeo JA, Sorkin LS, Watkins LR, editors. *Immune and glial regulation of pain*. Seattle: IASP Press; 2007) (Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience Letters* 2006; 391:108-111). Биологами было высказано предложение о разработке новых методов лечения боли, основанных на участии электронной транспортной цепи при невропатиях, зависящих от АТФ (Joseph EK, Levine JD. Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 2006; 121:105-114) (Joseph EK, Levine JD. Multiple PKC-dependent mechanisms mediating mechanical hyperalgesia. *Pain* 2010; 150:17-21). Также была отмечена митохондриальная зависимость фактора роста нервов (NGF) при индуцировании механической гипералгезии (Chu C, Levine E, Gear RW, Bogen O, Levine JD. Mitochondrial dependence of nerve growth factor-induced mechanical hyperalgesia. *Pain* 2011; 152:1832-1837).

Согласно этим идеям, множество иммунных медиаторов, вовлеченных в процесс валлеровского перерождения (WD), которое происходит тогда, когда непрерывность нервного волокна нарушается, были предложены в качестве новых мишеней для лечения NP лекарственными средствами (Debovy P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy* 2011; 193: 267-275) (Lingor P, Koch JC, Tanges L, Bahr M. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell Tissue Res* 2012; 349:289-311). Роль, выполняемая нейроиммунной активацией, микроглия-нейронной сигнализацией и окислительным стрессом, также была признана в усилении передачи после повреждений нервов (Berger JV, Knaepen L, Janssen SPM, Jaken RJP, Marcus MAE, Joosten EAJ, Deumens R. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Research Reviews* 2011; 67: 282-310) (De Leo JA, Tawfik VL, La Croix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: Path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain* 2006;122:17-21) (Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines *Journal of Neuroimmunology* 2010; 229:26-50) (Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radical Biology & Medicine* 2011 ;51:951-966).

Следовательно, новые стратегии, направленные на нейропротективное действие и, в частности, нейровоспаление для лечения NP, на сегодня находятся на этапе научных исследований и разработки (Bordet T and Pruss RM. Targeting neuroprotection as an alternative approach to preventing and treating neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 2009; 6:648-662) (Stavniichuk R, Drel VR, Shevalye H, Maksimchyk Y, Kuchmerovska TM, Nadler JL, Obrosova IG. Baicalein alleviates diabetic peripheral neuropathy through inhibition of oxidative-nitrosative stress and p38 MAPK activation. *Experimental Neurology* 2011; 203:106-113).

Старение и неврологические и психиатрические расстройства вызывают повреждение и смерть нейронов. Среди частых и соответствующих изменений нервной системы мы включили, помимо прочего, дегенерацию нейронов, ишемию, воспаление, иммунные реакции, травму и рак. В результате них, нейроны могут погибать за минуты или часы, или они могут выдерживать исходное повреждение в поврежденном состоянии, активируя нейродегенерацию и, наконец, также приводя к смерти клеток.

Учитывая важность нервной системы для создания основных двигательных навыков и чувствительности, существует интерес к поиску терапевтического средства для защиты нервной системы.

Нейропротективное действие направлено на сохранение, восстановление, лечение или регенерацию

нервной системы, ее клеток, структуры и функции (Vajda et al 2002, J Clin Neurosci 9:4-8). Одной из целей нейропротективного действия является предотвращение или минимизация влияния первоначального поражения нервной системы или предотвращение или минимизация последствий эндогенных или экзогенных вредных процессов, которые вызывают повреждение аксонов, нейронов, синапсов и дендритов.

Нейропротективное действие представляет собой механизм и стратегию, используемые для защиты от повреждения нейронов или дегенерации ЦНС в результате хронического нейродегенеративного заболевания (болезнь Альцгеймера, Паркинсона). Целью нейропротективного действия является ограничение дисфункции/смерти после травмы ЦНС и попытка сохранить максимально возможную целостность для клеточных взаимодействий в головном мозге, что приводит к нетронутой нейронной функции.

Концепция нейропротективного действия была применена к хроническим заболеваниям головного мозга, а также к острым неврологическим состояниям, учитывая, что некоторые из основных механизмов, поражающих ЦНС, подобны этим состояниям. Нейродегенеративные расстройства включают AD, РО, болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз. Нейропротективное действие рассматривалась как механизм действия лекарственного средства, используемый для лечения этих состояний.

Существует широкий спектр нейропротекторных продуктов, доступных или исследуемых, и некоторые продукты могут потенциально использоваться для более чем одного заболевания, учитывая, что многие механизмы повреждения нейронных тканей подобны. Продукты с нейропротекторными эффектами сгруппированы в следующие категории: похитители свободных радикалов, антиоксиданты, ингибиторы апоптоза (запрограммированная гибель клеток), противовоспалительные агенты, нейротрофические факторы, хелатные ионы металлов, модуляторы ионных каналов и генная терапия.

Было продемонстрировано, что свободные радикалы кислорода связаны с денатурализацией белков, инактивацией ферментов и повреждением ДНК, что приводит к перокислению липидов клеточных мембран и, наконец, гибели клеток при нейродегенеративных заболеваниях.

Исследования, проведенные как на моделях животных, так и на человеческих моделях, показывают, что потеря равновесия среди частиц-окислителей, генерируемых метаболизмом в мозге и антиоксидантными защитными механизмами, вызывает так называемый окислительный стресс, когда указанные системы защиты снижают свою эффективность и нарушаются.

Говоря в общем, стратегии лечения часто основаны на модуляции одного фактора предлагаемого поражения. Хотя мы можем наблюдать, что указанные виды лечения являются выгодными в очень ограниченных животных моделях, менее вероятно, что они продемонстрировали бы свою эффективность при более сложных человеческих расстройствах с более высокой степенью тяжести поражения в генетически разнообразной популяции (Faden and Stoica, 2007. Arch Neurol 64: 794-800). В значительной степени, учитывая предполагаемые механизмы гибели нейронов, такие как окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, добавленные белки, апоптоз и воспаление (oudim, M.B., and Buccafusco, JJ (2005) CNS Targets for multifunctional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinsons diseases J. Neural Transm 112, 519-537), они настолько сложны, насколько они различны, нам были бы необходимы отдельные соединения, которые имеют многоцелевые эффекты на множественные механизмы поражений.

Соединение (3-этоксикарбонил-2-метил-4-(2-нитрофенил)-4, 11-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,2,5]бензодиазепин) (JM-20), которое описано в документе патента республики Куба CU23879 по его химической структуре, может оказывать влияние на сердечно-сосудистые, цереброваскулярные и другие заболевания, связанные с центральной нервной системой.

Неожиданно исследователями было обнаружено, что соединение JM-20 оказывает выраженное терапевтическое действие на ЦНС предпочтительно для лечения невропатической боли.

Таким образом, сущность данного изобретения основана на использовании JM-20 и его химических продуктов, которые предпочтительно используются при лечении невропатической боли.

Несмотря на то, что потенциальная полезность JM-20 отмечена в литературе, его потенциал в качестве терапевтического лекарственного средства при невропатической боли, не установлен.

В качестве дополнительного аспекта настоящего изобретения, соединение общей формулы III (JM-20), его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически протестированные пролекарства могут быть введены в смеси по меньшей мере с одним средством-средой, разбавителем и/или носителем, химически инертным, нетоксичным, здесь и далее признаваемым вспомогательными веществами, включенными в предлагаемые композиции лекарственных средств.

Композиции лекарственных средств обеспечиваются для любой жидкой, твердой или полутвердой композиции, они могут быть введены перорально, букофарингеально, сублингвально, парентерально, например: внутримышечно, внутривенно, внутрикожно или подкожно, местно, трансдермально, трахеально, бронхиально, назально, пульмонально, ректально или другими подходящими путями введения.

Описанные композиции лекарственных средств будут содержать подходящие вспомогательные вещества для каждого состава. Составы получают обычно при помощи способов, существующих в данной области техники. Вспомогательные вещества выбирают по их выбранной форме лекарственного средства согласно пути, которым их будут вводить.

Соединение общей формулы III (JM-20), его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства для его введения людям могут содержаться в фармацевтически при-

емлемых формах дозировок, среди которых, помимо прочего, находятся эти формы выпуска: таблетки (включая подъязычные, с покрытием и разжевываемые), твердые и мягкие капсулы (включая микрокапсулы, наночастицы и пеллеты), растворы (пероральные капли, сиропы), парентеральные растворы, трансдермальные пластыри, импланты и другие системы ретард, мази (кремы и гели), назальные спреи, мукоадгезивы, суппозитории, суспензии, порошки, которые необходимо разводить или добавлять в пищу, помимо прочих форм дозировок, включенных в настоящее изобретение.

Используя известные технологические процессы уровня техники, JM-20, его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства, можно составлять в лекарственные формы, приспособленные к их введению, смешивать их с вспомогательными веществами, такими как вспомогательные жидкие, твердые или полутвердые вещества, состоящие из органических и неорганических веществ, природного или синтетического происхождения. Некоторые из них включают: твердые наполнители, разбавители, агглютинирующие вещества, растворители, эмульсии, смазывающие средства, дезинтегрирующие средства, способствующие скольжению средства, ароматизаторы, красители, пигменты, полимеры, подсластители, пластификаторы, усилители поглощения, усилители проникновения, поверхностно-активные вещества, вспомогательные поверхностно-активные вещества, специальные масла и/или буферные системы, которые придают активным соединениям или их физиологически приемлемым солям физическую, химическую и/или биологическую стабильность.

Некоторые вспомогательные вещества, используемые в составе лекарственных форм, содержащих соединение общей формулы III или его продукты, без ограничения использованием других вспомогательных веществ, представляют собой: крахмалы, лактазу, целлюлозу и ее продукты, сахарозу, сорбит, маннит и другие сахара, тальк, коллоидный диоксид кремния, карбонаты, оксиды магния, фосфаты кальция, диоксид титана, поливинилпирролидон, повидон, желатин, белки молока, цитраты, тартраты, альгинаты, декстран, этилцеллюлозу, циклодекстрины, эластомеры кремния, полисорбаты, амилопектин, парабены, животные и растительные масла, пропиленгликоль, стерилизованную воду, одно- или многоатомные спирты, такие как глицерин, стеарат магния, стеарат кальция, натрия стеарилфумарат, лаурилсульфат натрия, глицерин и воски полиэтиленгликоля, помимо прочего.

Твердые пероральные лекарственные формы, такие как таблетки, микрогранулы, наночастицы, пеллеты, порошки, которые необходимо разводить, или капсулы, содержащие соединение общей формулы III или его соли, энантиомерные формы и продукты окисления-восстановления согласно данному изобретению, могут быть использованы для немедленного или модифицированного высвобождения.

Выбранная форма лекарственного средства, согласно настоящему изобретению, представляет собой таблетки, содержащие, в качестве своего активного фармацевтического ингредиента, соединение общей формулы III или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, пролекарства, получение смеси с микрокристаллической целлюлозой, кукурузным крахмалом, кросповидоном, добавление растворенного поливинилпирролидона и лаурилсульфата натрия с получением гранулята, который сушат в полном процессе в псевдооживленном слое и смешивают со стеаратом магния и тальком, затем таблетки получают при помощи системы вращающихся штампов для их изготовления, наконец на таблетки наносят покрытие из гидроксипропилцеллюлозы, полиэтиленгликоля 4000, диоксида титана и окрашивающей суспензии.

Путем нанесения покрытия на таблетки мы достигаем привлекательный конечный вид и избегаем неприятного вкуса; это достигается маскирующим вкус средством, таким как сополимер метакриловой кислоты, этилцеллюлоза, метилгидроксипропилцеллюлоза или другие полимеры. Таблетки могут быть получены как методом влажной грануляции, показанным выше, так и методом прямого прессования при помощи вспомогательных веществ для прямого прессования и снижения количества стадий на фазе получения таблеток, при условии, что работают с низкими дозами.

Таблетки могут быть с модифицированным высвобождением, и они могут содержать соединение общей формулы III или его продукты в микрогранулах, наночастицах или матричных системах, используя вспомогательные вещества, такие как: полиэтиленоксид, гидроксипропилцеллюлоза 2910, стеарат магния, хлорид натрия, красный оксид железа, ацетат целлюлозы, полиэтиленгликоль 3350 и опадрай.

Согласно настоящему изобретению, композиции лекарственного средства могут содержать фармацевтически приемлемые полимеры, проницаемые, биоразлагаемые и нерастворимые в воде, для регулирования его профиля высвобождения, при этом получая модифицированное высвобождение (немедленное, отсроченное или регулируемое) лекарственных форм. Эти полимеры могут быть использованы для покрытия таблеток, микрогранул, капсул при получении наночастиц, в качестве матриц высвобождения в пеллетах, таблетках, гранулах или смесях с другими вспомогательными веществами, включенными в любую другую лекарственную форму, указанную в настоящем изобретении.

Для перорального введения другие подходящие фармацевтические композиции представляют собой твердые капсулы, мягкие капсулы и фармацевтические порошки, соединение общей формулы III или его соли, энантиомерные формы и продукты его физиологически приемлемых окисления-восстановления можно дозировать в виде твердых желатиновых или целлюлозных капсул, например, содержащих внутри смесь активного фармацевтического ингредиента с обычно используемыми вспомогательными веществами в твердой форме, такими как описанные для таблеток; указанную смесь можно получать сухим пу-

тем, влажной грануляцией, экструзией, таблетированием, в виде микрокапсул или микротаблеток. Для доз в мягких желатиновых капсулах мы используем обычные способы изготовления, и они могут включать смешивание соединения общей формулы III или его солей, гидратов, кристаллических форм, энантиомеров, изомеров, метаболитов, пролекарств с растительными маслами, жиром или другими подобными средами, подходящими для их образования.

В случае фармацевтических порошков, они могут быть получены простым смешиванием соединения общей формулы III (JM-20) или его солей, энантиомерных форм и продуктов его физиологически приемлемых пролекарств с наполнителями, суспендирующими средствами, подсластителями, ароматизаторами и консервантами. Хотя в настоящем изобретении также используется метод сушки атомизацией при температуре на входе 100-150°C и температурах на выходе 50-90°C при получении порошков, используются вспомогательные вещества, такие как декстран, полиэтиленгликоль 4000 и лаурилсульфат натрия, помимо прочего, для улучшения растворимости активного фармацевтического ингредиента для его надлежащего введения в организм в растворах, или добавления его в пищу, такую как соки.

Для ректального введения соединения общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно дозировать в виде суппозитория, пен или ректальных растворов для микроклизма, которые могут содержать смесь активных соединений с основой из нейтрального твердого жира (Witespol 45) или некоторых других подобных сред, подходящих для их составления; сорбитан моноолеат, полисорбат 20, воск-эмульгатор, ангидратный коллоидный силикон, мета-бисульфит натрия, эдатат динатрия, метилпарагидроксибензоат, фосфаты натрия, макрогол 300, глицерин, воду, пропан, изобутен и н-бутан.

Для жидкого перорального введения соединения общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять как сиропы, эликсиры, концентрированные капли или суспензии с фармацевтически приемлемой средой, такой как смесь этанола, глицерина, пропиленгликоля и/или полиэтиленгликоля, помимо прочего, карбоксиметилцеллюлоза или другие загустители; он может содержать краситель, ароматизатор, подсластитель (сукралозу, аспартам, цикламат, стевию) и консервант (парабены, бензоаты). Эти жидкие дозировки можно получать на основе разбавления порошкообразных фармацевтических композиций подходящим разбавителем перед использованием.

Для парентерального введения соединения общей формулы III (JM-20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять в виде растворов для инъекции. Эти растворы могут содержать стабилизирующие, консервирующие и/или буферные ингредиенты.

В настоящем изобретении активный фармацевтический ингредиент находится в 69% этанольном растворе, бензойном спирте, пропиленгликоле, бензойной кислоте, бензоате натрия, гидроксиде натрия, воде для инъекции; другие вспомогательные вещества также можно использовать, такие как полиэтиленгликоль 400, цитрат натрия и лимонная кислота.

Растворы для парентерального введения, которые содержат соединение общей формулы III (JM 20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства, можно также получать путем разведения сухой фармацевтической композиции (лиофилизированной) подходящим разбавителем перед использованием, включая использование вспомогательных веществ, таких как манит, полисорбат 80, хлорид натрия и другие.

Для подкожного введения соединения общей формулы III (JM 20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно дозировать в виде имплантов при помощи вспомогательных веществ, таких как эластомеры кремния и ангидратный коллоидный силикон, хотя для составления пеллеты могут быть использованы другие фармацевтические полимеры.

Для трансдермального введения соединения общей формулы III (JM 20) или его соли, гидраты, кристаллические формы, энантиомеры, изомеры, метаболиты, физиологически приемлемые пролекарства можно составлять в виде пластырей; в этом случае активный фармацевтический ингредиент содержится в подложке из акрилового полимера, этанол, легкий жидкий парафин, изопропилпальмитат, полиэтилентерефталат, этиленвинилацетат раствор и слоя силикона внутри отрывного слоя (с номинальной скоростью высвобождения 15 мг/день, на площади поверхности 12,75 см²).

Примеры реализации

Получение синтетического промежуточного продукта, 1,4-дигидропиридина 5-формиата.

Соединение II получают на основе превращения I через оксихлорид фосфора, в сухом диметилформамиде, смесь которых затем добавляют в пропорции 3-9 раз для растворения I в дихлорметане или хлороформе и состаривают при температуре 20-60°C в течение 15-20 ч (фиг. 1).

Полученный продукт затем подвергают основному гидролизу, с последующей экстракцией хлороформом или дихлорметаном, очисткой посредством промывания и сушкой.

Соединение I получают многокомпонентной реакцией на одной стадии, где в эквимольных количествах смешивают 2-нитробензола альдегид, кислота Мелдрума, этилацетоацетат и ацетат аммония, в

уксусной кислоте в качестве растворителя и подвергают нагреванию с обратным холодильником в течение 7-10 ч. После этого смесь выливают в воду, и полученный осадок очищают посредством перекристаллизации в этаноле.

Получение соединения III.

Соединение IIa или IIb, полученное ранее, подвергают реакции с ортофенилендиамином в абсолютном этаноле с получением соединения III (JM-20), которое может быть получено с образованием различных солей, в зависимости от условий и используемых реагентов.

Получение соединения III из IIa.

Для получения соединения III (JM-20) мы начали с этанольного раствора соединения IIa и добавили эквимолярные количества ортофенилендиамина, в абсолютный этанол в качестве растворителя, с перемешиванием. Эквимолярные количества или большие (1-2 эквивалента) триэтиламина (фиг. 2, способ A) добавляли в реакционную смесь, поддерживали перемешивание или добавляли достаточные количества (1 - 1,5 эквивалента) гидроксида натрия путем контролируемого капанья и с непрерывным перемешиванием реакционной смеси (фиг. 2, способ B).

Получение соединения III из IIb.

Для получения соединения III (JM-20), мы начали с соединения IIb в этанольном растворе и добавили эквимолярные количества ортофенилендиамина, в абсолютный этанол в качестве растворителя, при перемешивании. Эквимолярные количества или большие (1-2 эквивалента) триэтиламина (фиг. 3, способ A) добавляли в реакционную смесь, поддерживали перемешивание или добавляли достаточные количества (1-1,5 эквивалента) гидроксида натрия путем контролируемого капанья и с непрерывным перемешиванием реакционной смеси (фиг. 3, способ B).

Структура изомера соединения JM20 показана на фиг. 4.

Получение соединения III в виде галогенгидратных солей.

Соответствующие гидрохлоридные или гидробромидные соли III (галогенгидраты JM-20) получали из IIa или IIb, соответственно, с или без использования катализатора. Когда соответствующую водородную кислоту добавляли в подходящих каталитических количествах (5-25 мольн. %), происходил каталитический процесс, который снижал время реакции и несколько снижал выход реакции (фиг. 5).

Гидрохлорид JM20 (IIIa) получали надлежащим образом из IIa, и когда подходящие количества HCl добавляли, происходила каталитическая реакция. Соединение JM-20 также может быть получено в виде гидробромиды (IIIb) из IIb (фиг. 5), причем характеристики бромиды являются лучшей целевой группой, чем хлорид, реакция внутримолекулярного нуклеофильного замещения облегчается, давая быструю и эффективную реакцию с получением JM-20 в виде гидробромиды.

Получение соединения III в виде фумаратной соли.

Фумаратную соль JM-20 (IIIc) получают из гидрохлорида или гидробромиды III при добавлении фумарата мононатрия в раствор IIIa или IIIb, с перемешиванием магнитной мешалкой 2-5 ч (фиг. 6) и его последующим осаждением при добавлении этанола в подходящих количествах.

Осадок, соответствующий фумарату IIIc, подходящим образом фильтруют и промывают, очищают и затем помещают в сушилку с регулируемой температурой под пониженным давлением.

Получение соединения III в виде фосфатной соли.

Фосфатную соль JM-20 (IIIд) можно получить способом, подобным тому, что описан выше, из IIa или IIb путем добавления эквимолярных количеств фосфорной кислоты в начале реакции или путем добавления фосфорной кислоты в IIIa или IIIb в этанольном растворе с перемешиванием (фиг. 7).

Получение соединения III в виде сульфатной соли.

Сульфат JM-20 (IIIf) можно получить из IIa или IIb или на основе галогенгидратов IIIa или IIIb, как показано на фиг. 8.

Получение состава в виде таблетки.

Каждая 120,00 мг таблетка содержит:

Компонент	Количество	Функция
JM 20	40,00 мг	Активный компонент
Кукурузный крахмал	23,00 мг	Дезинтегрирующее вещество
Поливинилпирролидон K-25	4,00 мг	Агглютинин
Моногидратированная лактаза	50,50 мг	Наполнитель
Стеарат магния	1,50 мг	Смазывающее вещество
Коллоидный диоксид кремния	1,00 мг	Смазывающее вещество

Этанол класса е*	12,00 мкл	Растворитель
Деионизированная вода*	12,00 мкл	Растворитель

*Испаряется в процессе сушки.

Краткое описание технологического процесса.

1. Просеять активный компонент, кукурузный крахмал и лактазу через сито 20 меш.
2. Взвесить все компоненты состава согласно количествам, установленным в формуле.
3. Для раствора агглютинина вылить смесь воды и этилового спирта класса С в металлический контейнер с паровой рубашкой, добавить поливинилпирролидон и встряхивать до полного растворения.
4. Загрузить в смеситель активный компонент, кукурузный крахмал и лактазу (компоненты внутренней фазы). Смешивать в течение 15 мин.
5. Добавить медленно раствор агглютинина при помощи перистальтического насоса, доводя до необходимой степени влажности при помощи воды и этилового спирта класса С (1:1) при необходимости. Размельчить в мельнице на низкой скорости.
6. Высушить гранулят в псевдооживленном слое. Через 10 мин отобрать типичный образец гранулята, дегранулировать и протестировать на его остаточную влажность; указанная влажность должна составлять от 0,8 до 1,2%.
7. Смешать сухой гранулят со смазывающими веществами в течение 10 мин.
8. В высокоскоростной центрифуге спрессовать смесь при помощи плоского, скошенного и бороздчатого штампа с диаметром 6,4 мм (1/4 PBR) с получением таблеток со следующими параметрами:

Масса: 120,0 мг ± 10 %

Высота: 2,6 ± 0,10 мм

Твердость: 4,0 ± 1 кг-с

Хрупкость: менее 1%

Получение состава для пероральных капель.

Каждый мл (20 капель) содержит:

Компонент	Количество	Функция
JM-20	40,0 мг	Активный компонент
Пропиленгликоль	300,0 мг	Среда-растворитель
Kollidon 25	160,0 мг	Способствующее регулированию вязкости средство
Сахаринат натрия	12,5 мг	Подсластитель
Понсо S, кислотный красный	0,05 мг	Краситель
Лимонная кислота	5,535 мг	Стабилизатор pH
Дегидратированный цитрат натрия	20,0 мг	Стабилизатор pH
Этиловый спирт	100,0 мг	Среда-растворитель
Метилпарабен	1,8 мг	Консервант а.т.
Пропилпарабен	0,2 мг	Консервант а.т.
Жидкий клубничный ароматизатор (растворимый)	20,0 мг	Ароматизатор
Очищенная вода (достаточное количество)	1,0 мл	Среда

Краткое описание технологического процесса.

1. Измерить pH и проводимость очищенной воды в момент изготовления продукта.
2. Вылить пропиленгликоль в реактор.
3. Растворить сахарин натрия в очищенной воде во вспомогательном резервуаре из нержавеющей стали с соответствующей емкостью.
4. Включить Kollidon 25, всыпая его понемногу, перемешивая в течение по меньшей мере 30 мин, пока он полностью не исчезнет.
5. Перемешивать и подавать тепло к препарату, поддерживая температуру на уровне 40-50°C в течение 30 мин.

6. Включить активный компонент в результат первого этапа небольшими порциями, поддерживая постоянное перемешивание в течение 30 мин.

7. Отвести тепло и подождать пока препарат не достигнет комнатной температуры: $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

8. Растворить метилпарабен и пропиленгликоль в этиловом спирте класса С в вспомогательном стакане или резервуаре из нержавеющей стали с подходящей емкостью, постоянно перемешивая, пока он полностью не растворится.

9. В результаты предыдущего этапа добавить растворимый жидкий клубничный ароматизатор и перемешивать до полной однородности.

10. Включить результаты предыдущего этапа медленно в реакторную емкость, постоянно и сильно ее перемешивая.

11. Растворить лимонную кислоту и дегидратированный цитрат натрия в стакане или резервуаре из нержавеющей стали, с подходящей емкостью, перемешивая его после каждого добавления до полного растворения.

12. Медленно внести результаты предыдущего этапа в реакторную емкость, постоянно и сильно ее перемешивая.

13. Растворить понсо S, кислотный красный в очищенной воде в стакане или резервуаре из нержавеющей стали с подходящей емкостью, перемешивания до полного растворения и введение препарата.

14. Снять предварительно приготовленный объем с водой. Перемешать до однородности.

15. Протестировать, что pH поддерживается на уровне 4,0-6,0.

16. Провести окончательное фильтрование; протестировать органолептические характеристики.

17. Поместить в бутылку окончательный препарат в бутылки из желтого стекла х 15 мл, с $15,0 \pm 1,0$ мл раствора, надлежащим образом закрыть крышкой, используя крышки с уменьшителями капель для маслянистых продуктов.

Получение инъекционного состава.

Каждая колба (2 мл) JM-20 содержит:

Компонент	каждый мл содержит	Количество на дозу Единица измерения	Функция
JM-20	5,0 мг	10,0 мг	Активный компонент
Cremofor ELP	527,0 мг	1054,0 мг	Среда
Соляная кислота 1 н достаточное количество	-	-	Не регулируемый по pH
Абсолютный спирт достаточное количество	1,0 мл	2,0 мл	растворитель
*Азот достаточное количество	-	-	

1. Проверить, что реактор полностью сухой после стерилизации; если нет, промыть его дегидратированным спиртом.

2. Приготовить раствор 1 н соляной кислоты для регулирования pH.

3. Добавить одну часть Cremofor ELP и дегидратированного спирта в реактор. Смешать при 420 об/мин.

4. Взвесить активный компонент и добавить порции дегидратированного спирта в химический стакан, содержащий его; диспергировать его стеклянной мешалкой и добавить в реактор; повторять эту операцию пока все активные компоненты не будут сметены и весь дегидратированный спирт не будет использован.

5. Поддерживать перемешивание в реакторе в течение 60 минут при 420 об/мин, пока активный компонент полностью не растворится.

6. Добавить остальной Cremofor ELP, сметая остаток дегидратированным спиртом, перемешивая его в течение 10 мин при 420 об/мин.

7. Определить pH раствора и довести его 1 н соляной кислотой до 5,0-6,0.

8. Добавить объем раствора добавлением дегидратированного спирта. Перемешивать в течение 5 минут при 420 об/мин.

9. Взять 10 мл раствора и направить его в лабораторию для контроля процесса (оценки и pH)

10. Проверить правильность установки систем наполнения и азотирования.

11. Провести проверку целостности на фильтре Sartobran P MidiCaps, пористостью (0,45+0,2 мкм) с дегидратированным спиртом.

12. После окончания контроля процесса, поднять давление реактора азотом (0,7-1,0 бар) для вытеснения раствора через картридж фильтра Sartobran P пористостью 0,45 мкм +0,2 мкм. Заполнить и запаять колбы, получая дозы 2,2 мл раствора.

Тоническая боль.

Мы изучали влияние JM-20 (10, 20, 40 мг/кг, перорально) на поведение относительно боли в модели тонической боли (тест с 5% формалина) у крыс. (Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats. Pain 1977;4:161-174).

Результаты показаны на фиг. 9 А, 9 В и 10.

Невропатическая боль.

Мы исследовали эффект JM-20 на модели постоянного стеноза седалищного нерва (CCI), модели NP (Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. Pain 2012; 153:359-365).

Результаты показаны на фиг. 11-15.

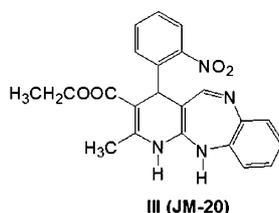
Вызванный каррагинаном перитонит.

Впоследствии мы разработали различные эксперименты в модели индуцированного СА перитонита у грызунов, чтобы исследовать возможную противовоспалительную активность JM-20 в этих условиях.

Результаты показаны на фиг. 16 А-Е.

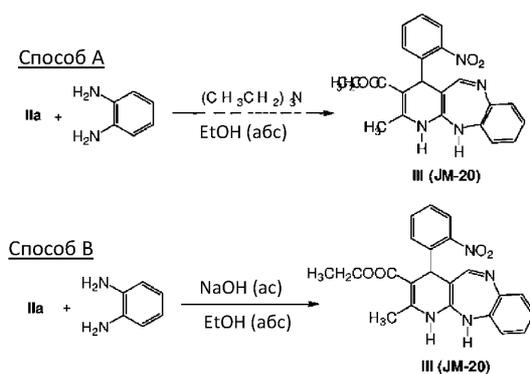
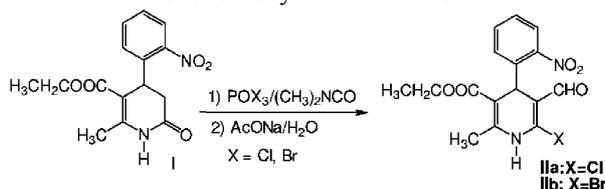
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

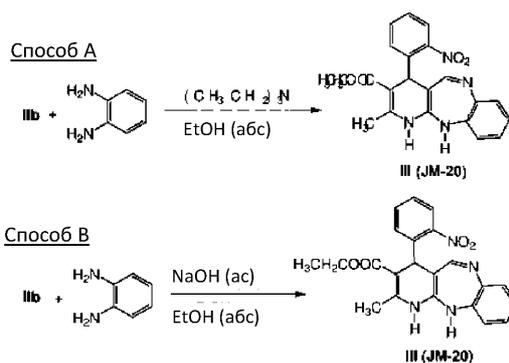
Применение соединения формулы



при лечении невропатической боли.

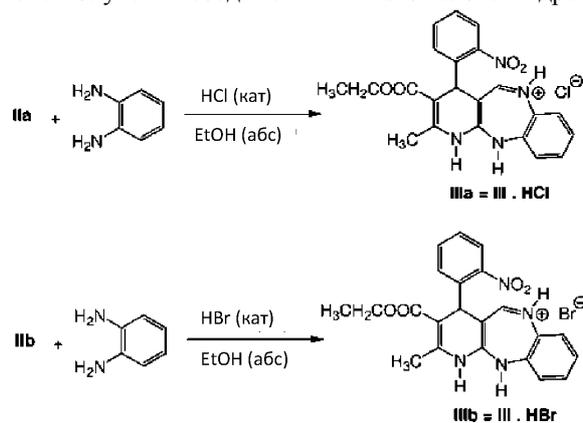
Схема получения IIa и IIb





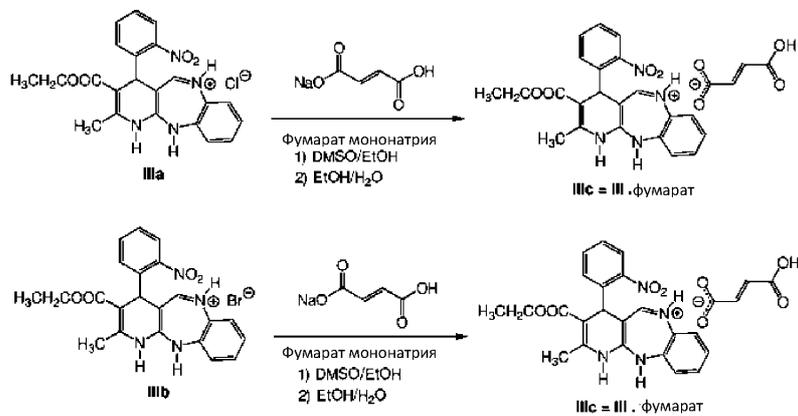
Фиг. 3, 4

Схема получения соединения III и его галогенгидратов



Фиг. 5

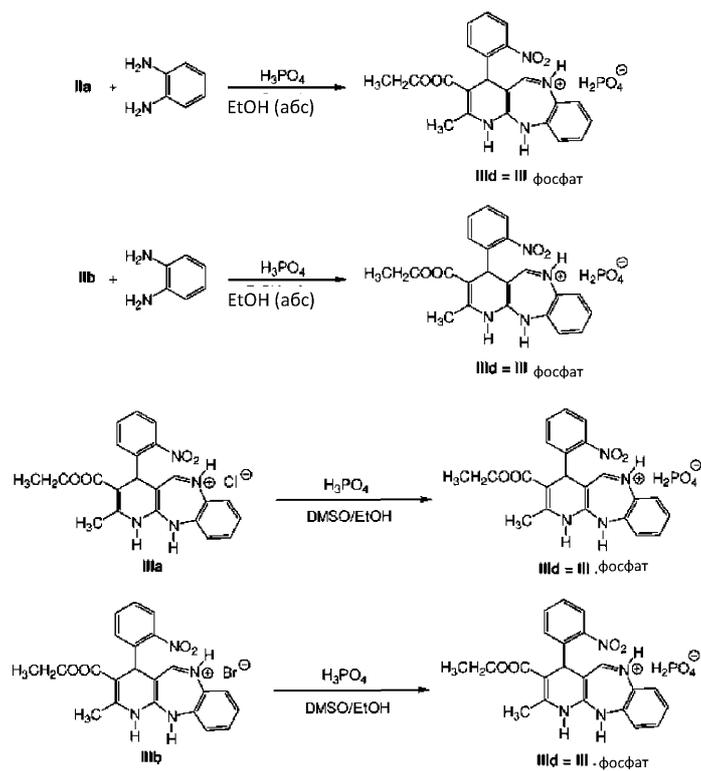
Получение фумаратной соли из JM-20 (IIIc)



Фиг. 6

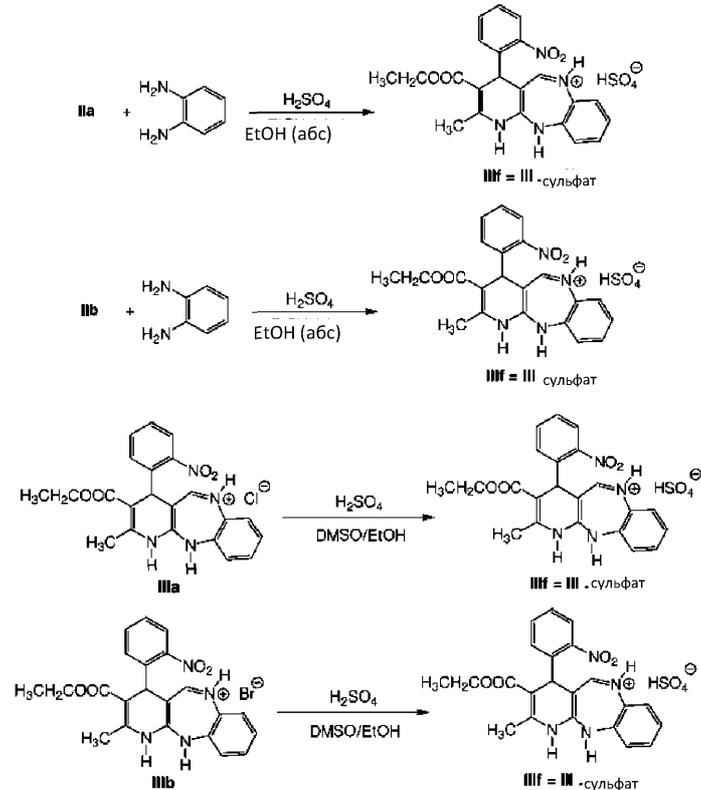
Получение фосфатной соли из JM-20 (IIIд)

Фумарат мононатрия



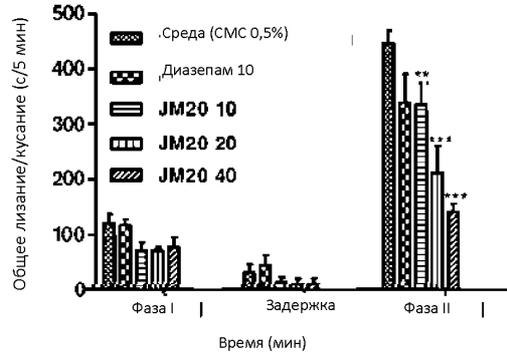
Фиг. 7

Получение сульфатной соли из JM-20 (IIIф)



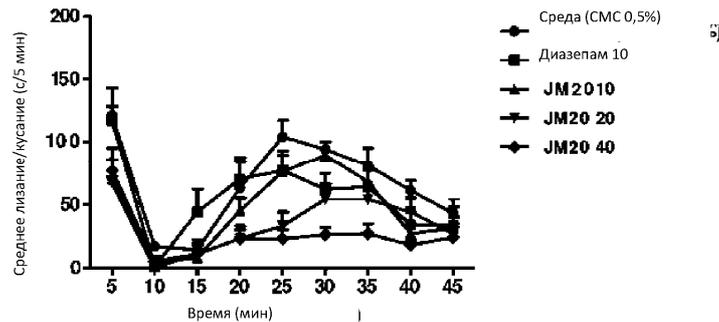
Фиг. 8

Влияние JM-20 (10-40 мг/кг, 10 мл/кг, перорально), диазепам 10 мг/кг или среда (СМС, 0,05%) на поведение лизания/кусания после инъекции 5% формалина на подошвенной поверхности лапы крысы. Данные представлены как общее среднее времени лизания/кусания \pm ЕЕМ на фазе I (0-5 мин), времени скополамин 1мг/кг (5-15 мин); скополамин (15-45 мин) или тест с формалином, $n=7$ на группу, $***p<0,001$ представляет значительные различия относительно контрольной группы, которую лечили средой (ANOVA для одного пути с последующим тестом Даннетта)



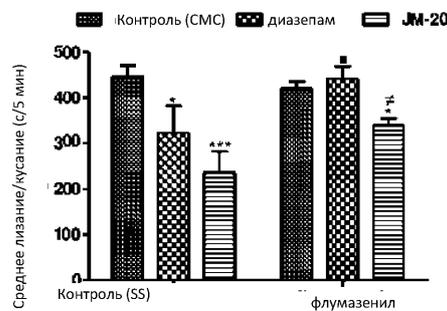
Фиг. 9А

Время влияния JM-20 (10-40 мг/кг, 10 мл/кг, перорально), диазепам 10 мг/кг или среда (СМС, 0,05%) на поведение лизания/кусания после инъекции 5% формалина на подошвенной поверхности лапы крысы. Данные представлены как среднее времени лизания/кусания (/5 мин/с) \pm ЕЕМ в течение 45 мин теста, $n=7$ на группу



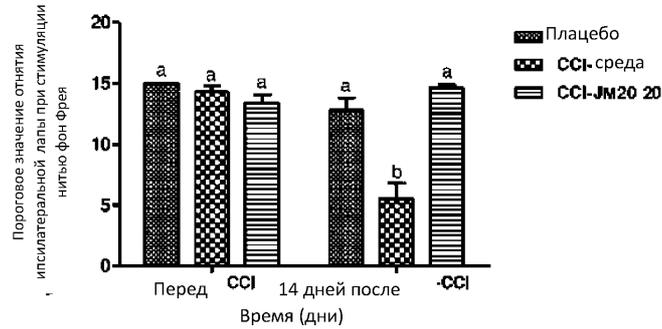
Фиг. 9В

Влияние предварительной обработки животных флумазенилом (10 мг/кг, интраперитонеально) на антигиперноцицептивный эффект JM-20 на фазе II теста с 5% формалином. Каждая колонка представляла время реакции 6-10 животных на группу как среднее \pm ЕЕМ, $*P<0,05$, $***P<0,001$ представляет статистические различия между группами лечения и контроля (только среда) $***p<0,05$ представляет статистические различия между группами, обработанными диазепамом в присутствии или в отсутствие флумазенила, $\#p<0,05$ представляет статистические различия между группами, обработанными JM-20 в присутствии или в отсутствие флумазенила



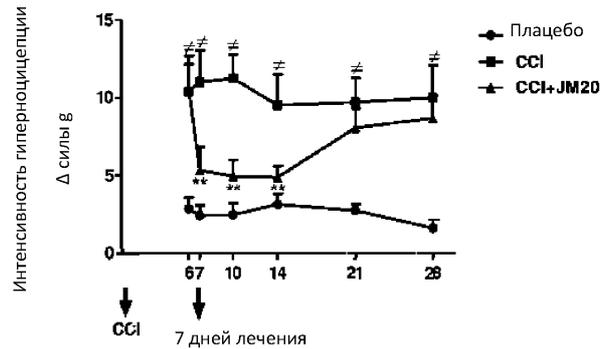
Фиг. 10

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на механическую аллодинию в ипсилатеральной лапе крыс СС1 через 14 дней после хирургии, определенное измерением реакции отнятия лапы при стимуляции нитью фон Фрея. Данные представлены как среднее \pm ЕЕМ 50% порогового значения реакции, $n=7$ на группу. Различные буквы представляют значимые различия между группами (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



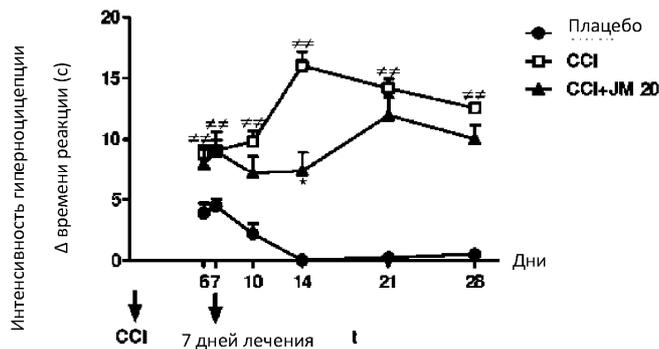
Фиг. 11

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на интенсивность механической гиперноцицепции ипсилатеральных лап крыс СС1, определенное измерением реакции отнятия лапы при стимуляции нитью фон Фрея. Данные представлены как среднее \pm ЕЕМ разницы пороговых значений (b.) для вывода в граммах, рассчитанных на основе вычитания среднего трех измерений различных временных интервалов из среднего трех измерений времени 0, $n=7$ на группу, $**p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $^{\#}p<0,05$ представляет статистические различия относительно группы холостой СС1 (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



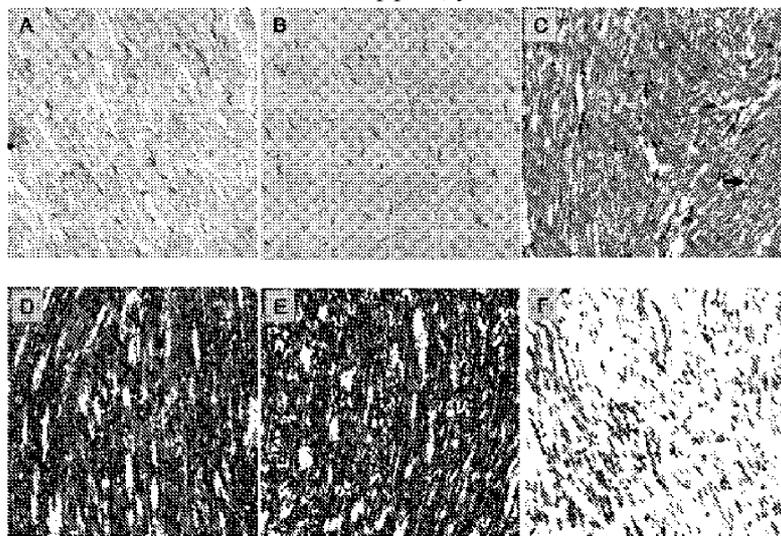
Фиг. 12

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 10 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на механическую гиперноцицепцию для постоянного давления на лапы путем модификации классического теста Рэндала-Селитто или SH Ferreira. Данные представлены как среднее \pm ЕЕМ разницы (b.) времени реакции, рассчитанного вычитанием измерения различных временных интервалов из измерения времени 0, $n=7$ на группу, $*p<0,05$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $^{\#\#}p<0,01$ представляет статистические различия относительно группы холостой СС1 (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



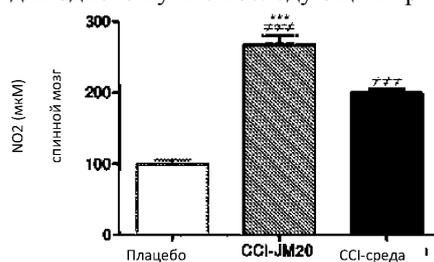
Фиг. 13

Влияние лечения при помощи JM-20 (20 мг/кг, перорально) с повторяющимися дозами в течение 7 дней, начиная на 7 день после СС1, на гистологические изменения, вызванные СС1 (валлеровское перерождение) на 14 день после хирургии. А, В и С показывают продольные сечения седалищного нерва на 5 мм от повреждения на крысах СС1 холостые, СС1, которых лечили JM-20, и лечили средой соответственно (окрашивание Н/Е). Мы можем наблюдать увеличение клеточности у животных СС1 по сравнению с животными, у которых проводили хирургию с плацебо, в результате пролиферации клеток Шаванна и инфильтрации макрофагов и потери упорядоченного выравнивания аксонов, связанных с их миелиновой оболочкой, по сравнению с СС1 с плацебо. Стрелка указывает на одну из многих камер переваривания клеток Шаванна, содержащих миелин овальной (красноватая овальная масса). D, E, F показывают срезы от одних и тех же животных, но они окрашены техникой luxol fast blue (LFB), специфической методикой для настойки миелина. В и E: снижение дезорганизации нервных волокон, вызванных СС1, и увеличение количества клеток и деградация миелиновых оболочек у животных, которых лечили JM-20, особенно этот последний эффект, указанный в E



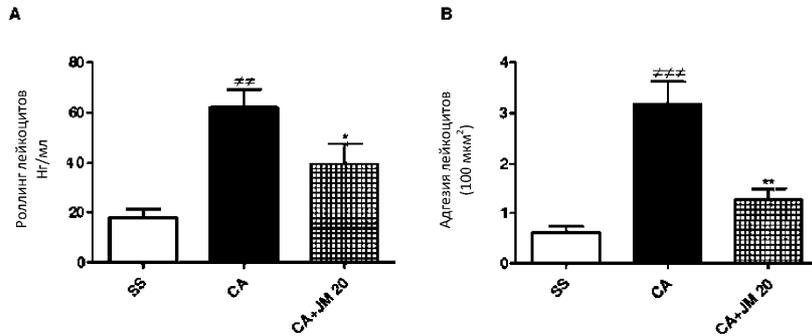
Фиг. 14

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на концентрации в спинном мозге нитратов в качестве индикатора концентраций оксида азота. Данные I представлены как среднее \pm ЕЕМ, n=7 на группу, $***p<0,001$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $###p<0,001$ представляет статистические различия относительно группы плацебо СС1 (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



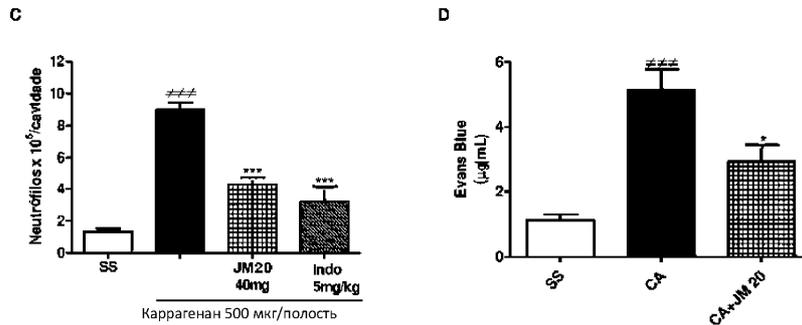
Фиг. 15

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на перитонеальный воспалительный ответ, вызванный каррагенаном (500 мкг/полость) у крыс. А. Роллинг лейкоцитов и В их адгезию к сосудистому эндотелию в брыжейке определяли прижизненным микроскопом через 4 ч после индукции воспаления. Данные I представлены как среднее \pm ЕЕМ, $n=7$ на группу, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, $p<0,001$, $p<0,01$ представляет статистические различия относительно контроля с внутрибрюшинным солевым раствором (ANOVA для одного пути с последующим тестом Ньюмана-Кейлс или Бонферрони в каждом конкретном случае)



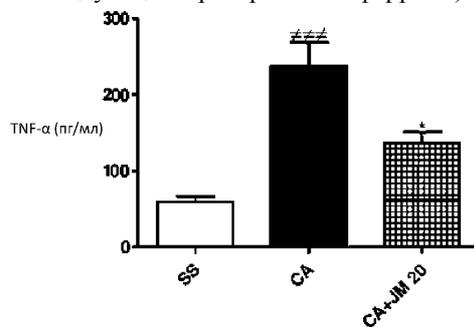
Фиг. 16А, В

Влияние JM-20 (40 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на внутрибрюшинный воспалительный ответ, вызванный каррагенаном (500 мкг/полость) С. Миграция лейкоцитов к брюшинной полости и D. проницаемость сосудов (мкг/мл) определяли через 4 ч после СА. Данные I представлены как среднее \pm ЕЕМ количества нейтрофилов/полость, $n=6$ на группу, * $p<0,05$, *** $p<0,01$ представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, #### $p<0,001$ представляет статистические различия относительно контроля с внутрибрюшинным солевым раствором (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



Фиг. 16С, D

Влияние JM-20 (20 мг/кг, 110 мл/кг, перорально) или среды (СМС, 0,05%) на концентрации фактора некроза опухолей (TNF α) в перитонеальной жидкости через 4 ч после инфицирования каррагенаном. Данные I представлены как среднее \pm ЕЕМ, n=6 на группу. *p<0,05 представляет статистические различия относительно контрольной группы, которую лечили средой, ###p<0,05 представляет статистические различия относительно контроля с внутривнутрибрюшинным солевым раствором (ANOVA для одного пути с последующим критерием Бонферрони)



Фиг. 16Е

