

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047894**

(13) **B1**

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

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 31/194</i> (2006.01) |
| 2024.09.26 | | <i>A61K 9/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>A61P 25/28</i> (2006.01) |
| 202091446 | | <i>A61P 25/16</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>A61P 9/10</i> (2006.01) |
| 2019.01.11 | | <i>A61P 1/16</i> (2006.01) |

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| (31) 62/616,923 | (56) US-B2-7358277 |
| (32) 2018.01.12 | US-A1-20060115538 |
| (33) US | WO-A2-2012104655 |
| (43) 2021.01.29 | US-A1-20120083531 |
| (86) PCT/IB2019/050240 | US-A1-20170360727 |
| (87) WO 2019/138379 2019.07.18 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕТИМЕДИ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
КО., ЛТД. (KR) | |
| (72) Изобретатель:
Чан Чон-Хван, Чон Кын-Ён (KR) | |
| (74) Представитель:
Нилова М.И. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к способу лечения хронических воспалительных заболеваний у субъектов, нуждающихся в этом, путем введения лактата кальция в качестве активного агента. Лактат кальция может содержаться в фармацевтической или пищевой композиции или композиции питательных веществ.

047894
B1

047894
B1

Уровень техники

Хроническое(ие) воспалительное(ые) заболевание(я) (ХВЗ) лежит(ат) в основе патологического состояния, характеризующегося хроническим воспалением, определяемым как длительное и устойчивое провоспалительное заболевание (1). ХВЗ включают множество обычных и необычных ХВЗ, таких как респираторные заболевания (например, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмонит и фиброз легких) (2), глазные заболевания (например, кератит и возрастная дегенерация желтого пятна) (3), аутоиммунные заболевания (4), нефропатия (5), нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, инсульт, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз) (6), сердечно-сосудистые заболевания (например, атеросклероз, артериосклероз и миокардит) (7), метаболические расстройства (например, диабет и ожирение) (8), заболевания опорно-двигательного аппарата (например, ревматоидный артрит и остеопороз) (9, 10), заболевания пародонта (например, пульпит и периодонтит) (11), заболевания пищеварительного тракта (например, неалкогольная жировая болезнь печени, гастроэнтерит и хроническое воспалительное заболевание кишечника) (12) и кожные расстройства (например, псориаз и атопический дерматит) (13, 14).

Эпидемиологическое исследование показало, что ХВЗ является основной причиной смертности во всем мире и растет в течение последних трех десятилетий. По оценкам, к 2030 году в Соединенных Штатах 171 миллион человек будут затронуты ХВЗ (15). Существуют различные типы противовоспалительных лекарственных средств для лечения воспаления, такие как аспирин, антигистаминные препараты, ингибиторы ЦОГ-2, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID). Тем не менее, существуют ограничения для длительного приема таких существующих лекарственных средств из-за побочных эффектов и временной эффективности.

В настоящем документе описан способ лечения хронического воспалительного заболевания, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

В настоящем документе описан способ лечения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, атеросклероза и/или инсульта, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

Также описан способ лечения рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и/или ревматоидного артрита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. В некоторых вариантах реализации способ предназначен для лечения НАЖБП, и НАЖБП представляет собой неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).

Также описан способ лечения пульпита и/или периодонтита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

Кроме того описан способ лечения воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. В некоторых вариантах реализации ВЗК представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

Кроме того описан способ лечения повреждения спинного мозга, внутримозгового кровоизлияния, инфаркта миокарда, кератита и/или диабетической ретинопатии, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

В настоящем документе описан способ лечения астмы, фиброза легких, ожирения, гастроэнтерита, хронического воспалительного заболевания кишечника и/или атопического дерматита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Также в настоящем документе описан способ лечения хронической обструктивной болезни легких, пневмонита, кератита, атеросклероза, артериосклероза, миокардита, диабета, ревматоидного артрита, пульпита, периодонтита и/или псориаза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Также в настоящем документе описан способ лечения болезни Альцгеймера, инсульта, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени, сепсиса и/или остеопороза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

В некоторых вариантах реализации лактат кальция вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель. В некоторых вариантах реализации фармацевтическую композицию представляют в виде жидкости, порошка, аэрозоля, формы для инъекции, формы для трансфузии жидкости, пластыря, капсулы, пилюли, таблетки, депо или суппозитория.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество лактата кальция в качестве активного агента и фармацевтически приемлемый полисахарид, полимер, липид или их комбинации. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полисахарид. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет от 1:<0,2 до 1:5. В некоторых вариантах реализации

массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет 1:<0,2. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет от 1:0,2 до 1:5.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит полимер и/или липид. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит полимер и липид, причем массовое отношение полимера к липиду составляет от 1:0,1 до 1:50. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет по меньшей мере 1:5. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет от 1:5 до 1:30.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полимер и/или липид. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит полимер и липид, причем массовое отношение полимера к липиду составляет от 1:0,1 до 1:50. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет по меньшей мере 1:5. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет от 1:5 до 1:30.

В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой композицию короткого действия. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой композицию длительного действия. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой инъекционную композицию.

В некоторых вариантах реализации полисахарид представляет собой производное целлюлозы, пектин, гиалуроновую кислоту, крахмал, гуаровую камедь, хитозан, желатин, коллаген, альгинат, альгиновую кислоту или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой полоксамер, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации липид представляет собой сложный эфир глицерина и моноили трижирной кислоты или полиэтиленгликоль, сложные эфиры полиэтиленгликоля с растительными маслами, сложные эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, кунжутное масло, соевое масло, касторовое масло, кукурузное масло, пальмовое масло, арахисовое масло, масло какао, хлопковое масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, миндальное масло, оливковое масло, гидрогенизированное масло, олеиновую кислоту, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту, миристиновую кислоту, каприновую кислоту, каприловую кислоту, лауриновую кислоту, стеариновую кислоту, этилолеат, изопропилпальмитат, октилдодецилмиристат, цетилпальмитат, лауриловый спирт, олеиловый спирт, цетиловый спирт, стеариловый спирт или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 40% активного агента высвобождается через 6 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 60% активного агента высвобождается через 12 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 80% активного агента высвобождается через 24 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 90% активного агента высвобождается через 48 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 40% активного агента высвобождается через 24 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 60% активного агента высвобождается через 48 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 80% активного агента высвобождается через 72 ч.

В некоторых вариантах реализации в результате применения фармацевтической композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200

мл водной среды, имеющей рН 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 90% активного агента высвобождается через 144 ч.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержится в стерильной емкости из стекла или полиолефина.

В некоторых вариантах реализации лактат кальция покрыт фармацевтически приемлемым кишечнорастворимым покрытием. В некоторых вариантах реализации кишечнорастворимое покрытие содержит фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), ацетатфталат целлюлозы (CAP), фталат поливинилацетата (PVAP), шеллак, полимер метакриловой кислоты и ее сложного эфира или их комбинации. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к кишечнорастворимому покрытию составляет от 10:0,5 до 1:1,5. В некоторых вариантах реализации в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до рН 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее примерно 20% активного агента высвобождается через 30 мин. В некоторых вариантах реализации в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до рН 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 30% активного агента высвобождается через 60 мин. В некоторых вариантах реализации в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до рН 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 50% активного агента высвобождается через 120 мин. В некоторых вариантах реализации в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до рН 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 10% активного агента высвобождается через 120 мин.

В некоторых вариантах реализации лактат кальция содержится в пищевой композиции или композиции питательных веществ, содержащих лактат кальция. В некоторых вариантах реализации пищевая композиция или композиция питательных веществ представляет собой инъекционную пищевую добавку.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Эксперимент *in vitro* с лейкозными моноцитами человека. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках THP-1 (лейкозные моноциты человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 2. Эксперимент *in vitro* с лейкозными моноцитами человека, дифференцированных в макрофаги. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат) (макрофаг MO) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 3. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с интерфероном гамма (IFN- γ) и липополисахаридом (ЛПС) (Макрофаг M1) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 4. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с интерлейкином-4 (IL-4) и интерлейкином-10 (IL-10) (макрофаг M2) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 5. Эксперимент *in vitro* с фиброзом печени. Результаты вестерн-блоттинга показали, что индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках LX-2 (звездчатая клетка печени человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 6. Эксперимент *in vitro* с эндотелиальными клетками человека. Результаты вестерн-блоттинга показали, что опосредованные гипоксией факторы (лактатдегидрогеназа A) снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в эндотелиальных клетках пупочной вены человека в условиях гипоксии.

Фиг. 7. Эксперимент *in vitro* с фибробластами человека. Результаты вестерн-блоттинга показали, что лактатдегидрогеназа B возрастает в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках CCD-18Co (фибробласты толстой кишки человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 8. Эксперимент *in vitro* с XB3 головного мозга. Результаты вестерн-блоттинга показали, что опосредованные гипоксией факторы снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках SK-N-SH (эпителий головного мозга) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 9. Эксперимент *in vitro* с XB3 печени. Результаты вестерн-блоттинга показали, что опосредованные гипоксией факторы изменяются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках HepG2 (эпителий печени) в условиях гипоксии.

Фиг. 10. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (TLR-4) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках HepG2 (эпителий печени) в условиях гипоксии.

Фиг. 11. Эксперимент *in vitro* с XB3 глаз. Результаты вестерн-блоттинга показали, что опосредованные гипоксией факторы снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 12. Результаты иммуноцитохимии показали, что индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α)

снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 13. Результаты иммуноцитохимии показали, что лактатдегидрогеназа А снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях нормоксии.

Фиг. 14. Результаты иммуноцитохимии показали, что фактор воспаления (ядерный фактор капша В) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 15. Результаты иммуноцитохимии показали, что фактор воспаления (toll-подобный рецептор 4) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 16. Результаты иммуноцитохимии показали, что лактатдегидрогеназа В возрастает в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 17. Результаты иммуноцитохимии показали, что маркер друзов (аполипопротеин Е) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 18. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

Фиг. 19. Фотографии показывают, что токсичность в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) при лечении 2,5 мМ лактатом кальция отсутствует. Лактат кальция играет важную роль только в метаболических изменениях поврежденных эпителиальных клеток.

Фиг. 20. Эксперимент *in vivo* с ХВЗ печени (НАСГ). Результаты химического анализа крови показали, что сывороточные аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) значительно снижаются в результате лечения 2 мг/кг лактатом кальция. ** $P < 0,001$ относительно группы с дефицитом метионина и холина (MCD). Результаты представляют собой среднее \pm СКО.

Фиг. 21. Иммуногистохимические результаты показали, что стеатоз в печени предотвращается в результате лечения 2 мг/кг лактатом кальция.

Фиг. 22. Иммуногистохимические результаты показали, что в группе, получавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, в печени отсутствуют липидные капли, тогда как они обнаруживаются в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

Фиг. 23. Иммуногистохимические результаты показали, что инфильтрация иммунных клеток в печени снижается в группе, получавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, тогда как инфильтрация иммунных клеток увеличивается в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

Фиг. 24. Иммуногистохимические результаты показали, что фиброз в печени в группе, получавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, отсутствует, тогда как он присутствует в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

Фиг. 25. Результаты вестерн-блоттинга показали, что фактор воспаления (NF- κ B) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в ткани пигментного эпителия сетчатки.

Фиг. 26. Иммуногистохимические результаты показали, что пигментный эпителий сетчатки восстанавливается в морфологии аналогично нормальному контрольному эпителию в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция.

Фиг. 27. Флуоресцентные изображения повреждения внутреннего слоя сосудистой оболочки плоских образцов в результате индуцированной лазером возрастной дегенерации желтого пятна (AMD). Фиг. 28. Флуоресцентные изображения повреждения внутреннего слоя и неоваскуляризации сосудистой оболочки плоских образцов в результате индуцированной лазером возрастной дегенерации желтого пятна (AMD).

Фиг. 29. Экспериментальная схема установления болезни Альцгеймера и инсульта.

Фиг. 30. Репрезентативные изображения повреждения головного мозга липополисахаридом (ЛПС). Контралатеральный: нормальный регион. Ипсилатеральный: инъекция ЛПС.

Фиг. 31. Восстановление поврежденной ткани головного мозга и снижение инфильтрации микроглии, рекрутированной при повреждении головного мозга.

Фиг. 32. Экспериментальная схема установления болезни Паркинсона.

Фиг. 33. Восстановление дофаминергического нейрона в результате лечения лактатом кальция.

Фиг. 34. Экспериментальная схема установления рассеянного склероза.

Фиг. 35. Восстановление демиелинизированного спинного мозга и снижение инфильтрации микроглии в результате лечения лактатом кальция.

Фиг. 36. Репрезентативные гистологические профили тканей аорты. Ткани с левой и средней стороны окрашиваются гематоксилином и эозином (H&E). Ткани на правой стороне окрашиваются масляным

красным О.

Фиг. 37. Трехцветное окрашивание по Массону тканей пародонта.

Фиг. 38. Трехцветное окрашивание по Массону верхней десны.

Фиг. 39. Трехцветное окрашивание по Массону тканей стопы и коленного сустава.

Фиг. 40. Экспериментальная схема индуцирования болезни Крона.

Фиг. 41. Репрезентативные изображения окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) при болезни Крона.

Фиг. 42. Экспериментальная схема индуцирования колита.

Фиг. 43. Репрезентативные изображения окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) при колите.

Подробное описание изобретения

В последнее время во многих исследованиях было показано, что ХВЗ связаны со зрелым возрастом, и было высказано предположение, что хроническое воспаление связано с возрастными заболеваниями старения иммунной системы (1-29). Было выявлено, что хроническое воспаление происходит через сложные взаимодействия между паренхимными клетками и стромальными клетками, такими как иммунные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты. Среди прочих, миелоидные клетки, такие как моноциты и активированные макрофаги, были идентифицированы как основные эффекторные клетки при ХВЗ. После активации бактериальным липополисахаридом, IFN-гамма и поврежденными клетками макрофаги продуцировали множество воспалительных цитокинов и очищали эндогенные и экзогенные воспалительные агенты посредством контроля транскрипции при помощи ядерного фактора каппа В (NF-kB). Макрофаги также были дополнительно поляризованы на более специализированные подтипы макрофагов. Тем не менее, их тонко контролируемая дифференцировка и активация миелоидных клеток не регулировались при хроническом воспалении. Локальная тканевая гипоксия вызывала метаболические изменения клеток, таких как паренхимные и стромальные клетки, за счет индуцирования индуцируемых гипоксией факторов (HIF). HIF, особенно HIF-1, способствуют аномальной активации макрофагов и вносят основной вклад в хронический воспалительный ответ.

Большинство ХВЗ характеризуются воспалением. Поврежденные ткани становятся недоступными кровотоку и доставке кислорода, тем самым продуцируя гипоксическую среду. Провоспалительные медиаторы и гипоксическое состояние могут вызывать ангиогенный ответ посредством индуцирования HIF-1. Кроме того, местная воспалительная реакция наблюдается при большинстве ХВЗ, включая респираторные заболевания (например, астму, хроническую обструктивную болезнь легких, пневмонит и фиброз легких), глазные заболевания (например, кератит и возрастную дегенерацию желтого пятна), аутоиммунные заболевания, нефропатию, нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, инсульт, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз), сердечно-сосудистые заболевания (например, атеросклероз, артериосклероз и миокардит), метаболические расстройства (например, диабет и ожирение), заболевания опорно-двигательного аппарата (например, ревматоидный артрит и остеопороз), заболевания пародонта (например, пульпит и периодонтит), заболевания пищеварительного тракта (например, неалкогольную жировую болезнь печени, гастроэнтерит и хроническое воспалительное заболевание кишечника) и кожные расстройства (например, псориаз и атопический дерматит). При воспалении проницаемость сосудов увеличивается, и под воздействием хемокинов происходит рекрутинг моноцитов, макрофагов, тромбоцитов, тучных клеток и других лейкоцитов. Таким образом, в настоящем документе описаны терапевтические подходы, нацеленные на активацию макрофагов и регуляцию деградации внеклеточного матрикса путем нацеливания на HIF-1, NF-kB и лактатдегидрогеназы (LAD) А и В.

Способы лечения.

В настоящем документе описан способ лечения хронического воспалительного заболевания, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. В настоящем документе описан способ лечения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, атеросклероза и/или инсульта, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Также описан способ лечения рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и/или ревматоидного артрита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. В некоторых вариантах реализации способ предназначен для лечения НАЖБП, и НАЖБП представляет собой неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Также описан способ лечения пульпита и/или периодонтита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Кроме того описан способ лечения воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. В некоторых вариантах реализации ВЗК представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

Кроме того описан способ лечения повреждения спинного мозга, внутримозгового кровоизлияния, инфаркта миокарда, кератита и/или диабетической ретинопатии, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

В настоящем документе описаны способы лечения астмы, фиброза легких, ожирения, гастроэнтери-

та, хронического воспалительного заболевания кишечника и/или атопического дерматита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Также в настоящем документе описаны способы лечения хронической обструктивной болезни легких, пневмонита, кератита, атеросклероза, артериосклероза, миокардита, диабета, ревматоидного артрита, пульпита, периодонтита и/или псориаза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция. Также в настоящем документе описаны способы лечения болезни Альцгеймера, инсульта, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени и/или сепсиса, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

Также в настоящем документе описаны способы лечения остеопороза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

Термин "субъект" или "пациент" охватывает млекопитающих и не млекопитающих.

Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, любого члена класса млекопитающих: людей, приматов, отличных от человека, таких как шимпанзе, и другие виды человекообразных обезьян и обезьян; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи; домашних животных, таких как кролики, собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки, и т.п. Примеры не млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, птиц, рыб и т.п. В некоторых вариантах реализации способов и композиций, предложенных в настоящем документе, млекопитающее представляет собой человека или не человека.

Применяемые в настоящем документе термины "лечить", "лечение" или "излечение" одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе, путем введения фармацевтической композиции относятся к любому снижению тяжести, задержке проявления, замедлению прогрессирования или сокращению одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе, постоянному или временному, длительному или непостоянному, которое может быть приписано или связано с введением композиции.

Термин "совместное введение" или аналогичные, применяемые в настоящем документе, охватывают введение выбранных двух или более активных агентов одному пациенту и включают схемы лечения, в которых агенты вводят одинаковыми или разными способами введения или в одно и то же или разное время.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему описанию можно вводить в терапевтически эффективном количестве, и применяемый в настоящем документе термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, достаточному для лечения или предотвращения заболеваний, при разумном отношении риск/польза, применяемому в любом медицинском лечении или профилактике. Эффективный уровень дозировки может быть определен в зависимости от тяжести заболевания, активности лекарственного средства или активного агента, возраста пациента, массы тела, состояния здоровья, пола, чувствительности к лекарственному средству, времени введения, способа введения и скорости выведения композиции согласно настоящему описанию, продолжительности лечения, лекарственных средств, применяемых одновременно или в комбинации с композицией согласно настоящему описанию, и других факторов, известных в области медицины. Фармацевтическую композицию согласно настоящему описанию можно вводить отдельно или в комбинации с другими общеизвестными лекарственными средствами или компонентами, известными как подходящие для лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе. Важно вводить композицию в минимальном количестве, которое обеспечивает максимальный эффект без проявления побочных эффектов, принимая во внимание все перечисленные выше факторы.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему описанию можно вводить так, чтобы доза лактата кальция в день составляла, например, от примерно 10 до примерно 1000 мг/кг, от примерно 10 до примерно 500 мг/кг, от примерно 10 до примерно 250 мг/кг, от примерно 10 до примерно 200 мг/кг, от примерно 10 до примерно 100 мг/кг, от примерно 1 до примерно 100 мг/кг, от примерно 1 до примерно 75 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 25 мг/кг или от примерно 1 до примерно 10 мг/кг. Частота введения композиции может составлять, но конкретно не ограничена ими, один раз, два раза, три раза, четыре раза и т.п. в день в виде отдельных доз.

Композиции, содержащие соединение(я), описанные в настоящем документе, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. При терапевтических применениях композиции вводят пациенту, уже страдающему от заболевания или состояния, в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичного облегчения симптомов заболевания или состояния. Количество, эффективное для указанного применения, зависит от тяжести и протекания заболевания или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента, массы и реакции на лекарственные средства и решения лечащего врача. Специалист в данной области техники может определять такие терапевтически эффективные количества при помощи обычных экспериментов (включая, но не ограничиваясь ими, клиническое испытание с повышением дозы).

При профилактических применениях композиции, содержащие активный агент, описанные в на-

стоящем документе, вводят пациенту, чувствительному или иным образом подверженному риску одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе. Такое количество определяется как "профилактически эффективное количество или доза". В указанном применении точные количества также зависят от состояния здоровья пациента, массы и т.п. Специалист в данной области техники может определять такие профилактически эффективные количества при помощи обычных экспериментов (включая, но не ограничиваясь ими, клиническое испытание с повышением дозы). При применении на пациенте эффективные количества для указанного применения зависят от тяжести и протекания заболевания, расстройства или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и реакции на лекарственные средства и решения лечащего врача.

В случае, когда состояние пациента не улучшается, по усмотрению врача введение активного агента, описанного в настоящем документе, можно осуществлять длительно, т.е. в течение продолжительного периода времени, в том числе на протяжении всей жизни пациента, для облегчения или контроля состояния иным образом или ограничения симптомов заболевания или состояния пациента.

Количество данного агента, которое соответствует такому количеству, варьируется в зависимости от таких факторов, как конкретное соединение, болезненное состояние и его тяжесть, индивидуальные особенности (например, возраст, масса, пол и т.п.) субъекта или хозяина, нуждающегося в лечении, но тем не менее может быть определено обычным способом, известным в данной области техники, в соответствии с конкретными обстоятельствами, связанными с указанным случаем, включая, например, конкретный вводимый агент, способ введения, состояние, подлежащее лечению, и субъект или хозяина, подлежащего лечению.

Фармацевтические композиции.

Термин "лактат кальция" относится к типу лактатной соли металла, которая может существовать, например, в виде гидрата, представленного формулой $C_6H_{10}O_6Ca \cdot 5H_2O$, в которой ион кальция связан с лактатом. Лактат кальция может находиться в форме белого порошка или гранул при комнатной температуре или может являться безводным при нагревании до $120^\circ C$ и имеет растворимость 5% (мас./об.).

Лактат кальция может быть представлен в виде фармацевтических композиций для лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе.

В различных вариантах реализации в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество лактата кальция в качестве активного агента, для лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый полисахарид, полимер, липид или их комбинации. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полисахарид.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложено кишечнорастворимое покрытие лактата кальция, так что активный агент защищен от кислой среды желудка и абсорбируется в тонкой кишке, прежде чем он достигнет толстой кишки, при введении активного агента перорально.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции короткого и длительного действия, содержащие лактат кальция. В некоторых вариантах реализации композиции длительного действия содержат лактат кальция, покрытый по меньшей мере одним кишечнорастворимым материалом, таким как фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), ацетатфталат целлюлозы (CAP), фталат поливинилацетата (PVAP), шеллак и полимер метакриловой кислоты и ее сложного эфира.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде фармацевтических препаратов для перорального введения. Примеры препаратов включают, но не ограничиваются ими, порошки, таблетки, капсулы, гранулы или сиропы, таблетки и капсулы.

Также в настоящем изобретении предложены составы гидрогелей, в частности, гидрогели на основе метилцеллюлозы, полноксамера, пектина и альгината, которые могут оставаться в форме раствора или наночастиц *in vitro*, и гель может образовываться при инъекции в организм и обеспечивать замедленное высвобождение лактата кальция. Относительно короткое время высвобождения лекарственного средства, являющееся недостатком гидрогеля, было улучшено за счет усиления взаимодействия между лекарственным средством и гидрогелем или путем задержки диффузии лекарственного средства в гидрогеле.

Массовое отношение лактата кальция к полисахариду может составлять, например, от $1: < 0,2$ до $1:5$, от $1:0,01$ до $1:5$, от $1:0,05$ до $1:5$ или от $1:0,1$ до $1:5$. Массовое отношение лактата кальция к полисахариду может составлять $1: < 0,2$. Массовое отношение лактата кальция к полисахариду может составлять от $1:0,2$ до $1:5$.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит полимер или липид. Массовое отношение лактата кальция к полимеру или липиду может составлять по меньшей мере $1:5$. Массовое отношение лактата кальция к полимеру или липиду может составлять от $1:5$ до $1:30$, например, от $1:5$ до $1:30$, от $1:5$ до $1:20$, от $1:5$ до $1:10$, от $1:10$ до $1:30$, от $1:10$ до $1:20$ или от $1:20$ до $1:30$.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция дополнительно содержит полимер и липид. Массовое отношение лактата кальция к полимеру и липиду может составлять по меньшей мере $1:5$. Массовое отношение лактата кальция к полимеру и липиду может составлять от $1:5$ до $1:30$, например, от $1:5$ до $1:30$, от $1:5$ до $1:20$, от $1:5$ до $1:10$, от $1:10$ до $1:30$, от $1:10$ до $1:20$ или от $1:20$ до $1:30$.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полимер или липид. Массовое отношение лактата кальция к полимеру или липиду может составлять по меньшей мере 1:5. Массовое отношение лактата кальция к полимеру или липиду может составлять от 1:5 до 1:30. Массовое отношение лактата кальция к полимеру или липиду может составлять от 1:5 до 1:30, например, от 1:5 до 1:30, от 1:5 до 1:20, от 1:5 до 1:10, от 1:10 до 1:30, от 1:10 до 1:20 или от 1:20 до 1:30.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полимер и липид. Массовое отношение лактата кальция к полимеру и липиду может составлять по меньшей мере 1:5. Массовое отношение лактата кальция к полимеру и липиду может составлять от 1:5 до 1:30. Массовое отношение лактата кальция к полимеру и липиду может составлять от 1:5 до 1:30, например, от 1:5 до 1:30, от 1:5 до 1:20, от 1:5 до 1:10, от 1:10 до 1:30, от 1:10 до 1:20 или от 1:20 до 1:30.

В некоторых вариантах реализации массовое отношение полимера к липиду может составлять от 1:0,1 до 1:50, от 1:0,1 до 1:20, от 1:0,1 до 1:10, от 1:0,1 до 1:5, от 1:0,1 до 1:2, от 1:0,1 до 1:1, от 1:0,1 до 1:0,5 или от 1:0,1 до 1:0,2.

Полисахариды, подходящие для применения в композиции, могут представлять собой производное целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу (СМС), этилцеллюлозу (ЕС), гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС), метилцеллюлозу (МС)), пектин, гиалуроновую кислоту, крахмал, гуаровую камедь, хитозан, желатин, коллаген, альгинат, альгиновую кислоту или их комбинации.

Полимеры, подходящие для применения в композиции, могут представлять собой полоксамер, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) или их комбинации.

Липиды, подходящие для применения в композиции, могут представлять собой сложный эфир глицерина и моно- или трижирной кислоты или полиэтиленгликоль, сложные эфиры полиэтиленгликоля с растительными маслами, сложные эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, кунжутное масло, соевое масло, касторовое масло, кукурузное масло, пальмовое масло, арахисовое масло, масло какао, хлопковое масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, миндальное масло, оливковое масло, гидрогенизированное масло, олеиновую кислоту, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту, миристиновую кислоту, каприновую кислоту, каприловую кислоту, лауриновую кислоту, стеариновую кислоту, этилолеат, изопропилпальмитат, октилдодецилмиристант, ацетилпальмитат, лауриловый спирт, олеиловый спирт, ацетиловый спирт, стеариловый спирт или их комбинации.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество лактата кальция в качестве активного агента, для лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе, причем лактат кальция покрыт фармацевтически приемлемым кишечнорастворимым покрытием. В некоторых вариантах реализации кишечнорастворимое покрытие содержит фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСР), ацетатфталат целлюлозы (САР), фталат поливинилацетата (PVPAR), шеллак, полимер метакриловой кислоты и ее сложного эфира или их комбинации. В некоторых вариантах реализации массовое отношение лактата кальция к кишечнорастворимому покрытию составляет от 10:0,5 до 10:15, от 10:0,5 до 1:1, от 10:0,5 до 10:5, от 10:0,5 до 10:3, от 10:0,5 до 10:2, от 10:0,5 до 10:1, от 10:0,5 до 1:0,8.

Термин "фармацевтически приемлемый", применяемый в настоящем документе, относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не ухудшает биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, т.е. материал можно вводить индивидууму, не вызывая нежелательные биологические эффекты или не взаимодействуя вредным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

Термин "фармацевтическая композиция", применяемый в настоящем документе, относится к смеси лактата кальция с другими химическими компонентами, которые являются фармацевтически приемлемыми, такими как, но не ограничиваясь ими, носители, стабилизаторы, разбавители, разрыхлители, суспендирующие агенты, загустители, связующие, противомикробные агенты, противомикробные консерванты, антиоксиданты и/или буферные агенты. Фармацевтическая композиция облегчает введение лактата кальция субъекту.

Термин "носитель", применяемый в настоящем документе, относится к относительно нетоксичным химическим соединениям или агентам, которые облегчают включение соединений в клетки или ткани. Термин "разбавитель" относится к химическим соединениям, которые применяют для разбавления интересующего соединения перед доставкой. Разбавители также можно применять для стабилизации соединений, поскольку они могут обеспечивать более стабильную среду. Фармацевтически приемлемые добавки включают, но не ограничиваются ими, разбавители, связующие, солубилизаторы, усилители растворимости, порообразователи, осмотические агенты, газообразователи, смазывающие агенты и псевдооживители, хорошо известные в данной области техники.

Разбавители могут включать, но не ограничиваются ими, лактозу, фруктозу, декстрозу, сахарозу, мальтозу, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал, гидрофосфат кальция, маннит или их смесь. Другие разбавители включают микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, маннит, фосфат кальция и т.п.

Примеры связующих могут включать повидон, гидроксипропилцеллюлозу, поливиниловый спирт,

гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и их комбинаций.

Солубилизирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, поверхностно-активные вещества, циклодекстрины и их производные, липофильные вещества или их смеси.

Поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, растворимые в воде или диспергируемые в воде неионные, неполярные неионные, анионные, катионные, амфотерные или ионные поверхностные активаторы или их смеси.

Примеры разрыхлителей включают кросповидон, кроскармеллозу натрия, натрия крахмалгликолят, и примеры смазывающих агентов включают стеарат магния, стеарат кальция, стеарилфумарат натрия и их комбинаций.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать противомикробные агенты, такие как бензиловый спирт, хлорбутанол, фенилэтиловый спирт, ацетат фенилртути, сорбат калия и сорбиновая кислота. Противогрибковые агенты включают такие соединения, как бензойная кислота, бутилпарабен, этилпарабен, метилпарабен, пропилпарабен и бензоат натрия.

В фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно добавлять противомикробные консерванты для их защиты от роста потенциально вредных микроорганизмов, которые обычно проникают в водную фазу, но в некоторых случаях могут также расти в масляной фазе композиции. Таким образом, консерванты, обладающие как водной, так и липидной растворимостью, являются желательными. Подходящие противомикробные консерванты включают, например, сложные алкиловые эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, пропионатные соли, феноксиэтанол, метилпарабен натрия, пропилпарабен натрия, дегидроацетат натрия, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, бензиловый спирт, производные гидантоина, соединения четвертичного аммония и катионные полимеры, имидазолидинилмочевину, диазолидинилмочевину и тринатрия этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

Для защиты всех ингредиентов фармацевтических композиций от повреждения или разложения под воздействием окисляющих агентов, присутствующих в самой композиции или в среде применения, можно добавлять антиоксиданты, например, аноксомер, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, гипофосфористую кислоту, метабисульфит калия, пропил-, октил- и додецилгаллат, метабисульфит натрия, диоксид серы и токоферолы.

Для поддержания желаемых значений pH фармацевтических композиций после того, как они устанавливаются, под воздействием внешних агентов и смещения равновесия компонентов композиции можно применять буферные агенты.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно готовить с применением следующих способов, известных в данной области техники, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), которые включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой композиции короткого действия. Термин "короткое действие" относится к композиции, которая высвобождает по существу весь активный агент за 48 ч в испытании на растворимость *in vitro*, описанном в настоящем документе, например, от времени доставки, времени 0, до времени от примерно 1 ч до примерно 48 ч, до времени от примерно 3 ч до примерно 24 ч, до времени от примерно 6 ч до примерно 24 ч или до времени от примерно 12 ч до примерно 24 ч.

Например, после начала применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование (например, от Labfine Co., Mumbai, India) при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 40% активного агента высвобождается через 6 ч, по меньшей мере примерно 60% активного агента высвобождается через 12 ч, по меньшей мере примерно 80% активного агента высвобождается через 24 ч и/или по меньшей мере примерно 90% активного агента высвобождается через 48 ч. В некоторых вариантах реализации после начала применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование (например, от Labfine Co., Mumbai, India) при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере от примерно 40% до примерно 60% активного агента высвобождается через 6 ч, по меньшей мере от примерно 60% до примерно 80% активного агента высвобождается через 12 ч, по меньшей мере от примерно 80% до примерно 90% активного агента высвобождается через 24 ч и/или по меньшей мере от примерно 90% до примерно 100% активного агента высвобождается через 48 ч.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой композиции длительного действия. Термин "длительное действие" относится к композиции, которая медленно высвобождает активный агент после введения начальной дозы, например, от времени доставки, времени 0, до времени от примерно 48 ч до примерно 192 ч, до времени от примерно 72 ч до примерно 192 ч, до времени от примерно 96 ч до примерно 192 ч, до времени от примерно 120

ч до примерно 192 ч или до времени от примерно 144 ч до примерно 192 ч.

В некоторых вариантах реализации после начала применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование (например, от Labfine Co., Mumbai, India) при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 40% активного агента высвобождается через 24 ч, менее примерно 60% активного агента высвобождается через 48 ч, менее примерно 80% активного агента высвобождается через 72 ч, менее примерно 90% активного агента высвобождается через 144 ч. В некоторых вариантах реализации после начала применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование (например, от Labfine Co., Mumbai, India) при 300 об/мин в 200 мл среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, от примерно 20% до примерно 50% активного агента высвобождается через 24 ч, от примерно 20% до примерно 40% активного агента высвобождается через 24 ч, от примерно 40% до примерно 70% активного агента высвобождается через 48 ч, от примерно 40% до примерно 60% активного агента высвобождается через 48 ч, от примерно 40% до примерно 80% активного агента высвобождается через 72 ч, от примерно 50% до примерно 80% активного агента высвобождается через 72 ч, от примерно 60% до примерно 90% активного агента высвобождается через 144 ч или от примерно 70% до примерно 90% активного агента высвобождается через 144 ч.

В некоторых вариантах реализации после начала применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до pH 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее примерно 20% активного агента высвобождается через 30 мин, менее 30% активного агента высвобождается через 60 мин, менее 50% активного агента высвобождается через 120 мин и/или менее 10% активного агента высвобождается через 120 мин.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой инъекционные лекарственные формы. В случае парентеральных инъекций подходящие составы могут включать водные или неводные растворы, предпочтительно с физиологически совместимыми носителями.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного(ых) соединения(й) в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активного агента можно получать в виде подходящих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липиды или липофильные носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Липид может представлять собой сложный эфир глицерина и моно- или трижирной кислоты или полиэтиленгликоль, сложные эфиры полиэтиленгликоля с растительными маслами, сложные эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, кунжутное масло, соевое масло, касторовое масло, кукурузное масло, пальмовое масло, арахисовое масло, масло какао, хлопковое масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, миндальное масло, оливковое масло, гидрогенизированное масло, олеиновую кислоту, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахионовую кислоту, миристиновую кислоту, каприновую кислоту, каприловую кислоту, лауриновую кислоту, стеариновую кислоту, этилолеат, изопропилпальмитат, октилдодецилмиристит, цетилпальмитат, лауриловый спирт, олеиловый спирт, цетиловый спирт, стеариловый спирт или их комбинации.

После начала медицинского применения гидрогелей было разработано и изучено множество гидрогелей во многих областях, включая медицинскую, фармацевтическую и косметическую индустрии. Хотя гидрогели, как правило, являются биосовместимыми, они характеризуются различными проблемами, которые ограничивают доставку лекарственного средства, и для решения указанных проблем предпринимаются различные усилия. Гидрогель представляет собой трехмерную структуру, состоящую из сетки гидрофильных полимеров. Более 90% компонентов составляет вода. Гидрогели активно изучают в биомедицинской области по причине их схожести с биотканью, например, по высокому содержанию влаги, пористой структуре, относительно мягким свойствам и биосовместимости. Гидрогели могут проявлять различные свойства в зависимости от вида полимера, применяемого в качестве основной цепи, или выбранного способа сшивания. При применении полимера из полиакриловой серии или синтетического соединения, такого как поливиниловый спирт, биосовместимость является низкой, но химическая модификация является простой, так что техническое применение является очень простым. С другой стороны, при применении в качестве основной цепи природных соединений, особенно пектина, альгината, коллагена, фибрина и гиалуроновой кислоты, химическая модификация затруднена. Тем не менее, имеются преимущества применения указанных материалов, которые являются компонентами, полученными биологическим путем, поэтому они подходят для клинического применения и характеризуются небольшим количеством побочных эффектов, таких как иммунная воспалительная реакция при трансплантации.

Способ сшивания, а также тип применяемого полимера влияют на свойства гидрогеля. Даже при применении в качестве основной цепи одного и того же полимера можно получать гидрогели, имеющие совершенно разные характеристики, если использовать разные способы сшивания. Способы сшивания гидрогелей можно в общем виде разделить на физические и химические способы. Физические способы

сшивания включают ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, образование водородной связи и обратимое сшивание посредством структурного переплетения. Указанные способы сшивания могут легко приводить к формированию трехмерной сетчатой структуры без необходимости наличия отдельной химической добавки или сложного процесса. С другой стороны, при химическом способе сшивания обычно образуется ковалентная связь, которая приводит к получению сетки, которая является необратимой и стабильной по сравнению с сеткой в случае физического способа сшивания. Гидрогели с превосходной биосовместимостью и различными физико-химическими свойствами широко изучаются в биомедицинских областях, таких как доставка лекарственных средств и тканевая инженерия. Из-за высокого содержания воды у большинства гидрогелей время высвобождения лекарственного средства меньше по сравнению с другими системами доставки лекарственных средств, и существует потребность в разработке системы с более длительным временем высвобождения лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой пероральные лекарственные формы. При пероральном введении соединения, описанное в настоящем документе, можно легко получать путем объединения активного агента с фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами, хорошо известными в данной области техники. Такие носители позволяют получать активный агент, описанный в настоящем документе, в виде таблеток, порошков, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, эликсиров, взвесей, суспензий и т.п. для перорального приема пациентов, подлежащим лечению.

Фармацевтические препараты для перорального применения можно получать путем смешивания одного или более твердых носителей с соединением, описанным в настоящем документе, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул, с последующим добавлением подходящих вспомогательных веществ, при желании, с получением таблеток или ядер драже. Подходящие вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; целлюлозные препараты, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия; или другие, такие как поливинилпирролидон (PVP или повидон) или фосфат кальция. При желании можно добавлять разрыхлители, такие как сшитая кроскармеллоза натрия, поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такую как альгинат натрия.

Ядра драже покрывают подходящими покрытиями. Для этого можно применять концентрированные растворы сахаров, которые необязательно могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбополовый гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лаков и подходящие органические растворители или смеси растворителей. В покрытия таблеток или драже можно добавлять красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций доз активных соединений.

Фармацевтические композиции могут быть преобразованы в лекарственные формы обычным способом с применением одного или более фармацевтически приемлемых носителей, содержащих вспомогательные вещества и добавки, которые облегчают превращение активного агента в препараты, которые можно применять в фармацевтических целях. Подходящая лекарственная форма зависит от выбранного способа введения. Любую из известных методик можно использовать как подходящую и понятную в данной области техники. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно изготавливать обычным способом, таким как, исключительно в качестве примера, при помощи обычных способов смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, заключения вовнутрь или прессования.

Водные суспензии также могут содержать один или более полимеров в качестве суспендирующих агентов. Полимер может представлять собой полоксамер, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) или их комбинации. Другие подходящие полимеры включают растворимые в воде полимеры, такие как целлюлозные полимеры, например, гидроксипропилметилцеллюлоза, и не растворимые в воде полимеры, такие как сшитые полимеры, содержащие карбоксильные группы. Подходящие композиции также могут содержать мукоадгезивный полимер, выбранный, например, из карбоксиметилцеллюлозы, карбомера (полимер акриловой кислоты), поли(метилметакрилата), полиакриламида, поликарбофила, сополимера акриловой кислоты и бутилакрилата, альгината натрия и декстрана.

В некоторых вариантах реализации предложены фармацевтические лекарственные формы, содержащие лактат кальция и фармацевтически приемлемое кишечнорастворимое покрытие для контроля высвобождения активного агента. В некоторых вариантах реализации покрытие представляет собой пленку, и в другом варианте реализации покрытие представляет собой мембрану. Кишечнорастворимое покрытие, например, пленка или мембрана, может служить для задержки высвобождения до выхода из желудка и для защиты активного агента от желудочной жидкости. Кишечнорастворимое покрытие может содержать одно или более веществ, предпочтительно полимерной природы (например, метакрилат и т.п.; полисахариды и т.п., как более подробно описано ниже), или комбинацию одного или более таких веществ, необязательно включающую другие вспомогательные вещества, такие как, например, пластифици-

каторы. В некоторых вариантах реализации кишечнорастворимое покрытие содержит фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), ацетатфталат целлюлозы (CAP), фталат поливинилацетата (PVAP), шеллак, полимер метакриловой кислоты и ее сложного эфира или их комбинации. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиция содержит полимер, образующий гидрогель, и дополнительные полимеры, способные обеспечивать желаемую задержку (или другое изменение) высвобождения активного агента.

В случае таблеток для перорального применения обычно применяемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Разбавители, подходящие для перорального введения в форме капсулы, включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал.

Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильную инъекционную суспензию в нетоксичном, парентерально приемлемом носителе, таком как липиды.

Количество лактата кальция, содержащегося в фармацевтических композициях, может составлять, но не ограничивается ими, от 1 до 50 мас.%, от 1 до 40 мас.%, от 1 до 35 мас.%, от 1 до 30 мас.%, от 1 до 20 мас.%, от 1 до 15 мас.% или от 1 до 10 мас.% в расчете на общую массу конечной композиции. Концентрация лактата кальция, содержащегося в одной дозе фармацевтической композиции, может составлять, но не ограничивается ими, от 2,5 до 100 мМ, от 2,5 до 50 мМ, от 2,5 до 25 мМ, от 5 до 100 мМ, от 5 до 50 мМ, от 5 до 25 мМ, от 10 до 100 мМ, от 10 до 50 мМ или от 10 до 25 мМ.

Твердые пероральные фармацевтические композиции можно получать при помощи обычных способов, таких как сухое гранулирование, прямое прессование, влажное гранулирование, экструзия с последующей сферонизацией, гранулирование из расплава или покрытие оболочкой путем прессования, но не ограничиваясь ими. Покрытие можно наносить, как описано ниже, и оно может варьироваться по толщине и плотности. Количество покрытия определяется дополнительной массой, добавленной (приобретенной) к сухой композиции (например, шарик или ядру, содержащему лактат кальция) согласно настоящему изобретению. Увеличение массы может находиться в диапазоне от 0,1 до 50%, от 1 до 20%, от 1 до 15%, от 3 до 10%, от 5 до 12% или от 8 до 12%.

Процесс нанесения покрытия можно осуществлять при помощи любого подходящего способа, такого как, например, применение устройства для нанесения покрытия, которое наносит раствор полимерного покрытия (в частности, как описано выше) на композицию. Полимеры для покрытия либо предоставляются производителем в виде готовых для применения растворов для непосредственного использования, либо могут быть получены перед использованием в соответствии с инструкциями производителя.

Стандартные лекарственные формы и наборы.

Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретной лекарственной форме, подходящей в качестве разовой дозировки, причем каждая лекарственная форма содержит заранее определенное количество активного ингредиента в сочетании с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом, при этом одну или более таких лекарственных форм применяют в течение всего режима дозирования для получения желаемого терапевтического эффекта, например, лечения одного или более заболеваний, описанных в настоящем документе.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут представлять собой стандартные лекарственные формы, подходящие для однократного введения точных дозировок. В стандартной лекарственной форме состав разделен на стандартные дозы, содержащие подходящие количества одного или более активных агентов. Стандартная доза может быть представлена в форме упаковки, содержащей отдельные количества состава. Неограничивающими примерами являются упакованные таблетки или капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Водные суспензионные композиции можно упаковывать в повторно не закрывающиеся емкости, содержащие одну дозу. Альтернативно, можно использовать повторно закрывающиеся емкости, содержащие несколько доз, и в указанном случае в композицию обычно добавляют консервант. Исключительно в качестве примера, составы для парентерального введения можно представлять в стандартной лекарственной форме, которая включает, но не ограничивается ими, ампулы, или в емкостях, содержащих несколько доз.

Суточные дозы, подходящие для лактата кальция, могут составлять от примерно 1 до примерно 1000 мг/кг, от примерно 10 до примерно 750 мг/кг, от примерно 10 до примерно 500 мг/кг или от примерно 100 до 500 мг/кг массы тела. Указанная суточная доза для крупных млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, людей, находится в диапазоне от примерно 5 мг до примерно 100000 мг, при этом ее удобно вводить в виде разделенных доз в режиме, включая, но не ограничиваясь ими, вплоть до четырех раз в день, или в форме длительного действия. Подходящие стандартные лекарственные формы содержат от примерно 10 до примерно 1000 мг, от примерно 100 до примерно 1000 мг, от примерно 500 до примерно 750 мг, от примерно 25 до примерно 250 мг, от примерно 50 до примерно 100 мг, от примерно 10 до примерно 200 мг или от примерно 10 до примерно 250 мг активного агента. Частота введения композиции согласно настоящему описанию может составлять, но конкретно не ограничивается ими, один, два, три, четыре раза и т.п. в день в виде отдельных доз. Подходящее "эффективное" количество в любом отдельном случае можно определять при помощи способов, таких как испытание с повышением дозы.

Указанные выше диапазоны являются исключительно иллюстративными, поскольку количество пе-

ременных в отношении индивидуального режима лечения является большим, и значительные отклонения от указанных рекомендуемых значений не являются редкостью. Такие дозировки можно изменять в зависимости от ряда переменных, не ограничиваясь активностью применяемого соединения, заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, способом введения, потребностями индивидуального субъекта, тяжестью заболевания или состояния, подлежащего лечению, и решением лечащего врача.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких терапевтических режимов можно определять при помощи стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, включая, но не ограничиваясь ими, определение LD₅₀ (доза, смертельная для 50% подопытных) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% подопытных). Дозовое отношение между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как отношение между LD₅₀ и ED₅₀. Соединения, демонстрирующие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, можно применять для определения диапазона дозировок для применения на людях. Дозировка активного агента предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с минимальной токсичностью. Дозировку можно варьировать в пределах указанного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого способа введения.

В соответствии с настоящим изобретением фармацевтические композиции могут находиться в форме стерильного инъекционного препарата, например, стерильной инъекционной водной или маслянистой суспензии. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить перорально в любой лекарственной форме, подходящей для перорального введения, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы.

Настоящее изобретение также относится к стерильной емкости из стекла или полиолефина, содержащей фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации емкость изготовлена из не-DEHP (бис(2-этилгексил)фталат (ди-2-этилгексилфталат, диэтилгексилфталат, DEHP; диоктилфталат, DOP) или не-PVP (поливинилпирролидон).

Набор включает подходящие емкости, такие как коробки, отдельные бутылки, пакеты или ампулы. Суспензионные композиции могут быть упакованы в повторно не закрывающиеся емкости, содержащие одну дозу, или повторно закрывающиеся емкости, содержащие несколько доз.

Документы № US2017/0360727A1, опубликованный 21 декабря 2017, и № PCT/IB2017/054091, дата подачи международной заявки: 7 июля 2017, включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки. Заявка на патент США №62/616923, поданная 12 января 2018, также включена в настоящий документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Примеры

Пример 1.

Клеточная культура для возрастной дегенерации желтого пятна.

Клеточную линию пигментного эпителия сетчатки человека, ARPE-19, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки ARPE-19 содержали в RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea).

Пример 2.

Клеточная культура для болезни Альцгеймера.

Клеточную линию головного мозга человека, SK-N-SH, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки SK-N-SH содержали в RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea).

Пример 3.

Клеточная культура для фибробластов.

Клеточную линию фибробластов толстой кишки человека, CCD-18-Co, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки CCD-18Co содержали в DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea).

Пример 4.

Клеточная культура для неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

Клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы человека, HepG2, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки HepG2 содержали в RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea).

Пример 5.

Клеточная культура для сосудистых заболеваний.

Линию эндотелиальных клеток пупочной вены человека, HUVEC, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки HUVEC выдерживали в питательной среде Endothelial Cell Growth Medium 2, входящей в состав питательной смеси Endothelial Cell Growth Medium 2 Supple-

ment MIX (PromoCell, Heidelberg, Germany).

Пример 6.

Макрофагальная культура.

Линию звездчатых клеток печени человека, LX-2, приобретали в Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Клетки LX-2 содержали в DMEM, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea).

Клеточную линию моноцитов человека, THP-1, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки THP-1 содержали в RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea) и 0,55 мкМ 2-меркаптоэтанола. Клетки культивировали при двух условиях, одни условия представляли собой увлажненную атмосферу при 37°C, содержащую 5% CO₂, а другие условия представляли собой условия культивирования при гипоксии с поддержанием при 1% кислорода, 5% и 94%.

Пример 7.

Реагенты.

Лактат кальция (CaLa) и липополисахарид (ЛПС) приобретали в Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). 2-Меркаптоэтанола приобретали в Gibco (Grand Island, NY, USA). Форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) приобретали в Enzo Lifesciences (Enzo Diagnostic, NY, USA). Интерферон-гамма человека, интерлейкин-4 человека (IL-4) и интерлейкин-10 человека (IL-10) приобретали в BPS Bioscience (San Diego, CA, USA). Раствор параформальдегида (ПФА) (4%) приобретали в Biosesang (Biosesang Inc., Gyeonggi, Korea).

Пример 8.

Анализ жизнеспособности клеток.

Графический анализатор живых клеток, JuLI™ Br (NanoEnTek Inc., Seoul, Korea), с клетками ARPE-19 применяли для подтверждения токсичности CaLa. Клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты с плотностью $2,5 \times 10^5$ клеток/луночка в среде. После инкубирования в течение 24 ч клетки обрабатывали 2,5 мМ CaLa в течение 12 ч и 24 ч. За клетками непрерывно наблюдали в течение 24 ч в течение времени обработки CaLa. (30, 31).

Пример 9.

Дифференцировка макрофагов.

Клеточную линию моноцитов человека, THP-1, приобретали в American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки THP-1 содержали в среде RPMI 1640 (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA), 100 МЕ/мл пенициллина (Welgene, Daegu, South Korea), 100 мкг/мл стрептомицина (Welgene, Daegu, South Korea) и 0,55 мкМ 2-меркаптоэтанола (Gibco, Grand Island, NY, USA). Клетки THP-1 содержали в увлажненной среде с 5% CO₂ при 37°C. Моноциты THP-1 дифференцировались в макрофаги в результате инкубирования в течение 12 ч с 100 мкг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) (Enzo Diagnostic, NY, USA) в среде RPMI1640. Макрофаги поляризовались в макрофаги M1 в результате инкубирования в течение 24 ч с 20 нг/мл IFN- γ (BPS Bioscience, San Diego, CA, USA) и 100 мкг/мл ЛПС (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) в среде RPMI 1640. Поляризацию макрофагов M2 осуществляли путем инкубирования в течение 24 ч с 20 нг/мл IL-4 (BPS Bioscience, San Diego, CA, USA) и 20 нг/мл IL-10 (BPS Bioscience, San Diego, CA, USA) в среде RPMI 1640. (32).

Пример 10.

Оптическое наблюдение за жизнеспособностью клеток.

Графический анализатор живых клеток, JuLI™ Br (NanoEnTek Inc., Seoul, Korea), с клетками ARPE-19 применяли для подтверждения токсичности CaLa. Клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты с плотностью $2,5 \times 10^5$ клеток/луночка в среде. После инкубирования в течение 24 ч клетки обрабатывали 2,5 мМ CaLa в течение 12 ч и 24 ч. За клетками непрерывно наблюдали в течение 24 ч в течение времени обработки CaLa.

Пример 11.

Вестерн-блоттинг анализ.

Для получения лизата цельных клеток клетки лизировали буфером для лизиса (1% NP-40, 0,25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% TritonX-100, 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 10% глицерина) с коктейлем ингибиторов протеаз (Roche, Basel, Switzerland) и ингибиторами протеаз (Na₃VO₄ 1 мМ, NaF 100 мМ). Затем измеряли концентрацию белка с применением набора для анализа на бисинхониную кислоту (BSA) (Thermo Scientific, Waltham, MA). Лизаты цельных клеток и ядерные лизаты переносили на поливинилденфторидные мембраны (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). После блокирования в 5% обезжиренном молоке (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) в течение 1 ч мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом, разбавленным в TBST, содержащей 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 М NaCl и 0,5% Tween-20, производства Sigma-Aldrich, в которую добавляли 5% BSA и 0,1% азид натрия (Sigma-Aldrich). Специфичными первичными антителами являлись антитела к HIF-1 α (1:1000),

HIF-2 α (1:1000), LDH-A (1:1000), LDH-B (1:1000), TLR-4 (1:1000), NF- κ B (1:1000), VEGF (1:1000), α -тубулину (1:1000), актину (1:1000) и GAPDH (1:5000). На следующий день мембраны промывали TBST и инкубировали в течение 2 ч с вторичным антикроличьим антителом (1:10000). Иммуноблоты получали с применением реагента для детектирования при вестерн-блоттинге (Abclone, Seoul, Korea) и подвергали воздействию при помощи рентгеновской пленки (Agfa, Leverkusen, Germany) в соответствии с протоколом производителя.

Пример 12.

Иммуноцитохимия.

Клетки ARPE-19 и SK-N-SH фиксировали на покровных стеклах с биопокрытием (BD bioscience, San Jose, CA, USA) при помощи 4% ПФА в течение 20 мин, а затем инкубировали с первичными антителами в течение 15 ч. Первичными антителами являлись следующие: HIF-1 α (1:300, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); LDH-A (1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); LDH-B (1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); NF- κ B (1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); TLR-4 (1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); apoE (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). После промывания с применением PBS клетки инкубировали с вторичным биотинилированным антимышиным антителом (1:2000, Vector Laboratorie, Burlingame, CA, USA) и визуализировали со стрептавидином, конъюгированным с флуоресцеином (Vector Laboratorie, Burlingame, CA, USA). Покровные стекла устанавливали на предметные стекла микроскопа при помощи монтирующей среды VECTASHIELD® Hard Set™ с DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Конфокальные флуоресцентные изображения получали с применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (LSCM, Nikon A1+, Tokyo, Japan) под масляно-иммерсионной линзой 60X.

Пример 13.

Животная модель для НАСГ.

Все эксперименты проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (IACUC-2017-0008). 5-недельных самок мышей C57BL/6 приобретали в КОАТЕС (Pyeongtaek, South Korea) и держали на метионин-холиновой диете (MCD) в течение 4 недель. Когда мыши набирали массу 15 г каждая, мышей случайным образом подвергали вскрытию для выявления неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). Мышам два раза в день (B.I.D) делали подкожную инъекцию лактата кальция (2 мг/кг) в течение 4 недель.

Пример 14.

Животная модель для возрастной дегенерации желтого пятна.

Все эксперименты проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (IACUC-2017-0008). Шестинедельных самок мышей C57BL/6 (20-25 г) приобретали в Orient (Charles River Korea, Seoul, Korea). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи (свет включали в 08:00) при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде. Мышей индивидуально помещали в индукционную камеру и индуцировали анестезию при помощи 2% изофлурана (HANA PHARM CO., Seoul, Korea). Индуцировали повреждения в каждом глазу мышей путем лазерной фотокоагуляции (SDL405-700, SD Laser, China). Применяли лазерные импульсы от синего лазера (длина волны, 405 нм; SD Laser). Параметры лазера представляли собой размер пятна 100 мкм, мощность 700 мВт и время воздействия 1 сек. В общей сложности 15 мышей случайно распределяли на три группы: (i) не подвергавшиеся лазерной индукции (n = 3); (ii) подвергавшиеся лазерным ожогам и получавшие инъекцию буферного носителя (n = 5); и (iii) CaLa, 2 мг/кг/день (B.I.D) (n=7). Лечение с применением CaLa начинали через несколько дней после лазерной фотокоагуляции и проводили путем подкожного введения в течение 14 дней. (33, 34).

Пример 15.

Гистологический анализ модели НАСГ.

Ткани печени мышей (n=5) иссекали и фиксировали в 4% параформальдегидном растворе PBS в течение 15 ч при 4°C. Фиксированные ткани печени заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 10 мкм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и применяли для окрашивания гематоксилином (Merck, Darmstadt, Germany) и эозином (H&E) (35). Изображения парафиновых срезов (толщиной 10 мкм), окрашенных H&E, получали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Пример 16.

Гистологический анализ возрастной дегенерации желтого пятна.

Гистопатологическое исследование поражений сетчатки проводили через 2 недели после подкожного введения 2 мг/кг CaLa. Энуклеированные глаза фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА) в течение 24 ч при 4°C и глаза, полученные путем удаления передних сегментов, три раза промывали фосфатно-солевым буфером. Фиксированные плоские образцы дегидрировали в градуированной серии рас-

творов этанола и заключали в парафин. Парафиновые срезы (толщиной 10 мкм) окрашивали гематоксилином (Merck, Darmstadt, Germany) и эозином (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (H&E) и визуализировали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Хориоидальное поражение и неоваскуляризацию плоских образцов исследовали путем конфокальной микроскопии (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Пример 17.

Трехцветное окрашивание по Массону.

Ткани печени мышей (n=5) иссекали и фиксировали в 4% параформальдегидном растворе PBS в течение 15 ч при 4°C. Фиксированные ткани заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 5 мм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и повторно фиксировали в растворе Буэна в течение 1 ч при 56°C, удаляли желтую окраску путем промывания проточной водопроводной водой в течение 5-10 мин и окрашивали раствором кислого фуксина с Бирихом алым в течение 5 мин, а затем в растворе фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот (отношение 1:1) в течение 30 мин и растворе анилинового синего и окрашивали в течение 15 мин. Недолго промывали в дистиллированной воде и в 1% растворе уксусной кислоты в течение 2-5 мин. Дегидрировали 95% этиловый спирт, переводили этиловый спирт в абсолютную форму и очищали в ксилоле. Фиксировали с монтирующей средой. Изображения получали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Пример 18.

Результаты.

Фиг. 1 представляет собой эксперимент *in vitro* с лейкозными моноцитами человека.

Результаты вестерн-блоттинга показывают, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках THP-1 (лейкозные моноциты человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 2 представляет собой эксперимент *in vitro* с лейкозными моноцитами человека, дифференцированными в макрофаги. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат) (макрофаг MO) в условиях нормоксии и гипоксии.

На фиг. 3 представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с интерфероном гамма (IFN- γ) и липополисахаридом (ЛПС) (макрофаг M1) в условиях нормоксии и гипоксии.

На фиг. 4 представлены результаты вестерн-блоттинга показывающие, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в дифференцированных клетках THP-1 с интерлейкином-4 (IL-4) и интерлейкином-10 (IL-10) (макрофаг M2) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 5 представляет собой эксперимент *in vitro* с фиброзом печени. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках LX-2 (звездчатая клетка печени человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 6 представляет собой эксперимент *in vitro* с эндотелиальными клетками человека. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что опосредованные гипоксией факторы (лактатдегидрогеназа А) снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в эндотелиальных клетках пупочной вены человека в условиях гипоксии.

Фиг. 7 представляет собой эксперимент *in vitro* с фибробластами человека. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что лактатдегидрогеназа В возрастает в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках CCD-18Co (фибробласты толстой кишки человека) в условиях гипоксии.

Фиг. 8 представляет собой эксперимент *in vitro* с ХВЗ головного мозга. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что опосредованные гипоксией факторы снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках SK-N-SH (эпителий головного мозга) в условиях нормоксии и гипоксии.

Фиг. 9 представляет собой эксперимент *in vitro* с ХВЗ печени. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что опосредованные гипоксией факторы изменяются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках HepG2 (эпителий печени) в условиях гипоксии.

На фиг. 10 представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие, что фактор воспаления (TLR-4) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках HepG2 (эпителий печени) в условиях гипоксии.

Фиг. 11 представляет собой эксперимент *in vitro* с ХВЗ глаз. Результаты вестерн-блоттинга показывают, что опосредованные гипоксией факторы снижаются в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях нормоксии и гипоксии.

На фиг. 12 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 13 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что лактатдегидрогеназа А снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сет-

чатки) в условиях нормоксии.

На фиг. 14 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что фактор воспаления (ядерный фактор каппа В) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 15 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что фактор воспаления (toll-подобный рецептор 4) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 16 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что лактатдегидрогеназа В возрастает в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 17 представлены результаты иммуноцитохимии, показывающие, что маркер друзов (аполипопротеин Е) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 18 представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) в условиях гипоксии.

На фиг. 19 показано, что токсичность в клетках ARPE-19 (пигментный эпителий сетчатки) при лечении 2,5 мМ лактатом кальция отсутствует. Лактат кальция играет важную роль только в метаболических изменениях поврежденных эпителиальных клеток.

На фиг. 25 представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие, что фактор воспаления (NF- κ b) снижается в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция в ткани пигментного эпителия сетчатки.

Пример 19.

Направленное воздействие на заболевания пищеварительного тракта (NFALD, НАСГ).

Материалы и способы.

Животная модель заболеваний печени. Все эксперименты проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (IACUC-2017-0008).

5-недельных самок мышей C57BL/6 приобретали в КОАТЕС (Pyeongtaek, South Korea) и держали на метионин-холиновой диете (MCD) в течение 4 недель. Мышам два раза в день (B.I.D) делали подкожную инъекцию лактата кальция (2 мг/кг) в течение 4 недель.

Гистологический анализ. Ткани печени мышей (n=5) иссекали и фиксировали в 4% параформальдегидном растворе PBS в течение 15 ч при 4°C. Фиксированные ткани печени заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 10 мкм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и применяли для окрашивания гематоксилином (Merck, Darmstadt, Germany) и эозином (H&E). Изображения парафиновых срезов (толщиной 10 мкм), окрашенных H&E, получали с применением микроскопа Leica DM1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Трехцветное окрашивание по Массону. Ткани печени мышей (n=5) иссекали и фиксировали в 4% параформальдегидном растворе PBS в течение 15 ч при 4°C. Фиксированные ткани заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 5 мм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и повторно фиксировали в растворе Буэна в течение 1 ч при 56°C, удаляли желтую окраску путем промывания проточной водопроводной водой в течение 5~10 мин и окрашивали раствором кислого фуксина с Бибрихом алым в течение 5 мин, а затем в растворе фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот (отношение 1:1) в течение 30 мин и растворе анилинового синего и окрашивали в течение 15 мин. Недолго промывали в дистиллированной воде и в 1% растворе уксусной кислоты в течение 2-5 мин. Дегидрировали 95% этиловый спирт, переводили этиловый спирт в абсолютную форму и очищали в ксилоле. Фиксировали с монтирующей средой. Изображения получали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Фиг. 20 представляет собой эксперимент *in vivo* с ХВЗ печени (НАСГ). Для индуцирования НАСГ мышей держали на диете с дефицитом метионина и холина (MCD) с полиненасыщенным жиром в течение 8 недель. Результаты химического анализа крови показывают, что сывороточные АСТ и АЛТ значительно снижаются в результате лечения 2 мг/кг лактатом кальция. **P < 0,001 относительно группы с дефицитом метионина и холина (MCD). Результаты представляют собой среднее \pm СКО.

На фиг. 21 представлены иммуногистохимические результаты, показывающие, что в группе, получавшей лечение лактатом кальция, в печени отсутствуют липидные капли (белые поры в тканях печени), тогда как они хорошо наблюдаются в группе с дефицитом метионина и холина (MCD). Стеатоз предотвращается в результате лечения 2 мг/кг лактатом кальция. Результаты показывают, что стеатоз предотвращается в результате лечения лактатом кальция.

На фиг. 22 представлены иммуногистохимические результаты, показывающие, что в группе, полу-

чавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, в печени отсутствуют липидные капли (белые поры в тканях печени), тогда как они обнаруживаются в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

На фиг. 23 представлены иммуногистохимические результаты, показывающие, что инфильтрация иммунных клеток в печени снижается в группе, получавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, тогда как инфильтрация иммунных клеток увеличивается в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

На фиг. 24 представлены иммуногистохимические результаты, показывающие, что фиброз в печени (место накопления коллагена; белые стрелки) в группе, получавшей лечение 2 мг/кг лактатом кальция, как и в контрольной группе, отсутствует, тогда как он присутствует в группе с дефицитом метионина и холина (MCD).

Пример 20.

Направленное воздействие на глазные заболевания (возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), кератит и диабетическая ретинопатия).

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с институциональными руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (IACUC-2017-0008). Шестинедельных мышей C57BL приобретали в Orient (Charles River Korea, Seoul, Korea). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи (свет включали в 08:00) при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение лактата кальция. Лактат кальция приобретали в Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Животная модель глазного заболевания. Мышей индивидуально помещали в индукционную камеру и индуцировали анестезию при помощи 2% изофлурана (HANA PHARM CO., Seoul, Korea). В обоих глазах мышей индуцировали вызванный лазером разрыв мембраны Бруха путем лазерной фотокоагуляции (SDL405-700, SD Laser, China). Применяли лазерные импульсы от зеленого лазера (длина волны, 532 нм; Visulas, 532; SD Laser). Параметры лазера представляли собой размер пятна 100 мкм, мощность 700 мВт и время воздействия 1 сек.

Получение хориоидальных плоских образцов. Через двадцать один день после лазерного повреждения мышей в каждой группе анестезировали и через левый желудочек проводили перфузию 1,0 мл PBS, содержащего 25 мг флуоресцеинизотиоцианат-декстрана (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Глаза энуклеировали и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 1 ч. Пигментный эпителий сетчатки-сосудистую оболочку-склеру глазных бокалов готовили путем разрезания глаза на полусферы с полным удалением хрусталика, стекловидного тела и сетчатки. Пигментный эпителий сетчатки-сосудистую оболочку-склеру глазных бокалов сплющивали путем создания четырех или пяти радиальных разрезов от края до экватора и фиксировали в сплющенной форме в Aqua-mount.

Гистологический анализ. Фиксированные плоские образцы дегидрировали в градуированной серии растворов этанола и заключали в парафин. Парафиновые срезы (толщиной 10 мкм) окрашивали гематоксилином (Merck, Darmstadt, Germany) и эозином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (H&E) и визуализировали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Хориоидальное поражение и неоваскуляризацию плоских образцов исследовали путем конфокальной микроскопии (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Результаты.

На фиг. 26 представлены репрезентативные изображения для H&E окрашивания при поражении внутреннего слоя плоских образцов сосудистой оболочки. Аномальную морфологию пигментного эпителия сетчатки наблюдали после индуцирования AMD (среднее изображение). Морфология пигментного эпителия сетчатки восстанавливалась аналогично нормальному контрольному эпителию (левое изображение) в результате лечения 2,5 мМ лактатом кальция (правое изображение).

На фиг. 27 представлены флуоресцентные изображения повреждения внутреннего слоя плоских образцов сосудистой оболочки в результате индуцированной лазером AMD. Повреждение сосудистой оболочки наблюдали после индуцирования AMD (среднее изображение). Повреждение сосудистой оболочки устранялось после лечения лактатом кальция (правое изображение).

На фиг. 28 представлены флуоресцентные изображения повреждения внутреннего слоя и неоваскуляризации плоских образцов сосудистой оболочки в результате индуцированной лазером AMD. Повреждение сосудистой оболочки и неоваскуляризацию наблюдали после индуцирования AMD (среднее изображение). Повреждение сосудистой оболочки и неоваскуляризация устранялись после лечения лактатом кальция (правое изображение), аналогично нормальному контролю (левое изображение).

Пример 21.

Направленное воздействие на болезнь Альцгеймера и инсульт.

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, уста-

новленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (LCDI-2018-0073). Восеминедельных самцов Крыс линии Спрега-Доули (SD) приобретали в Samtako Co. (Osan, Gyeonggi-do, Republic of Korea) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение липополисахаридов (ЛПС) и лактата кальция. Растворяли 1 мг порошка ЛПС в 1 мл солевого раствора. Хранили пробирки во льду при применении свежеприготовленного ЛПС. Для длительного хранения предпочтительными являются флаконы с завинчивающейся крышкой. Аликвоты хранили при -20°C. Лактат кальция приобретали в Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Внутричерепная инъекция ЛПС. Животных помещали в небольшую акриловую клетку, которую соединяли с аппаратом для анестезии, который позволял им свободно дышать в условиях газовой анестезии (2% изофлуран, Spartanburg, SC, USA). После достижения полной анестезии животного его помещали на операционный стол (поддерживая газовую анестезию), при этом верхний отдел шеи подвергали гиперэкстензии для обнажения хвостовой области. Мех животного на голове сбивали при помощи электрической машинки для стрижки и кожу обтирали йодом. ЛПС хранили во льду перед применением. Все хирургические материалы дезинфицировали 70% этанолом. Внутреннее пространство цилиндра шприца Гамильтона очищали дистиллированной водой и 70% этанолом. Шприц Гамильтона помещали в держатель шприца. Животное в стереотаксическом аппарате помещали в горизонтальное положение. Скальпелем делали срединный разрез (примерно 1 см) на коже головы. Иглу шприца Гамильтона помещали на брегму. Считывали три координаты (AP: -3,6, LM: 2,0 и DV: -3,8) на манипуляторе (в мм) и записывали их; использовали их в качестве исходного значения. Медленно устанавливали координату DV места инъекции; при этом вставляли кончик иглы в головной мозг до достижения места инъекции. Раствор ЛПС (2 мкл) высвобождали при примерной скорости потока 0,5 мкл/мин. После инъекции углу удаляли очень медленно. Область раны закрывали путем зашивания, а затем наносили дезинфицирующее средство. Крысу помечали для дальнейшей идентификации.

Иммуногистохимия. Ткань головного мозга нарезали на слои толщиной 5 мкм на криостате и окрашивали для гистологического исследования. Изображения получали на микроскопе при 200X увеличении. Для иммуногистохимии срезы блокировали 1% BSA и 10% NGS в 0,05 М PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем подвергали взаимодействию с кроличьим анти-Iba-1 (1:1000, Bioss, MA, USA) при 4°C в течение двух ночей. Систему окрашивания ABC применяли для визуализации микроглии (Iba-1) в срезах (Vector Laboratories, CA, USA).

Результаты.

На фиг. 29 представлена экспериментальная схема установления болезни.

Альцгеймера и инсульта. ОМТ-110 представляет собой лактат кальция. На фиг. 30 представлены репрезентативные изображения, демонстрирующие повреждение головного мозга под воздействием ЛПС. Контралатеральный: нормальный регион. Ипсилатеральный: инъекция ЛПС.

На фиг. 31 показано восстановление поврежденной ткани головного мозга и снижение инфильтрации микроглии, рекрутированной при повреждении головного мозга. Результаты показывают, что воспалительная реакция, которая усугубляет болезнь Альцгеймера и инсульт, значительно уменьшается.

Пример 22.

Направленное воздействие на болезнь Паркинсона.

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (LCDI-2018-0073). Восеминедельных самцов крыс линии Спрега-Доули (SD) приобретали в Samtako Co. (Osan, Gyeonggi-do, Republic of Korea) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение дезипрамина, 6-OHDA и лактата кальция. Дезипрамин (12,5 мг/кг; блокатор переносчиков норадреналина; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) растворяли в солевом растворе для внутрибрюшинной инъекции. 6-OHDA (20 мкг/крыса, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) растворяли в солевом растворе для внутричерепной инъекции. 2 мг/кг лактата кальция (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Инъекция дезипрамина и 6-OHDA. Животным делали инъекцию дезипрамина в брюшинную полость (внутрибрюшинная инъекция) за 30 мин до инъекции 6-OHDA. Через 30 мин после инъекции дезипрамина животных помещали в небольшую акриловую клетку, которую соединяли с аппаратом для анестезии, который позволял им свободно дышать в условиях газовой анестезии (2% изофлуран, Spartanburg, SC, USA). После достижения полной анестезии животного его помещали на операционный стол (поддерживая газовую анестезию), при этом верхний отдел шеи подвергали гиперэкстензии для обнажения хвостовой области. Мех животного на голове сбивали при помощи электрической машинки для

стрижки и кожу обтирали йодом. Все хирургические материалы дезинфицировали 70% этанолом. Внутреннее пространство цилиндра шприца Гамильтона очищали дистиллированной водой и 70% этанолом. Шприц Гамильтона помещали в держатель шприца. Животное в стереотаксическом аппарате помещали в горизонтальное положение. Скальпелем делали срединный разрез (примерно 1 см) на коже головы. Иглу шприца Гамильтона помещали на брегму. Считывали три координаты (AP: -5,6, LM: 2,0 и DV: -7,6) на манипуляторе (в мм) и использовали их в качестве исходного значения. Медленно устанавливали координату DV места инъекции; при этом вставляли кончик иглы в головной мозг до достижения места инъекции. Раствор 6-ОНДА (20 мкг/4 мкл) высвобождали при примерной скорости потока 1 мкл/мин. После инъекции углу удаляли очень медленно. Область раны закрывали путем зашивания, а затем наносили дезинфицирующее средство. Крысу помечали для дальнейшей идентификации.

Иммуногистохимия. Ткань головного мозга нарезали на слои толщиной 5 мкм на криостате и окрашивали для гистологического исследования. Изображения получали на микроскопе при 200X увеличении. Для иммуногистохимии срезы блокировали 1% BSA и 10% NGS в 0,05 М PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем подвергали взаимодействию с кроличьей анти-тиразингидроксилазой (1:500, Chemicon, Токуо, Япония) при 4°C в течение двух ночей. Систему окрашивания ABC применяли для визуализации дофаминергического нейрона в срезах (Vector Laboratories, CA, USA).

Результаты.

На фиг. 32 представлена экспериментальная схема установления болезни Паркинсона. ОМТ-110 представляет собой лактат кальция.

На фиг. 33 показано восстановление дофаминергического нейрона в результате лечения лактатом кальция. Болезнь Паркинсона представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое влияет на выработку дофамина путем разрушения дофаминергических нейронов в определенной области головного мозга (черная субстанция).

Пример 23.

Направленное воздействие на рассеянный склероз и повреждение спинного мозга.

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (LCDI-2018-0073). Восьминедельных самцов крыс линии Спрега-Доули (SD) приобретали в Samtako Co. (Osan, Gyeonggi-do, Republic of Korea) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение липополисахаридов (ЛПС) и лактата кальция. Растворяли 1 мг порошка ЛПС в 1 мл солевого раствора. Хранили пробирки во льду при применении свежеприготовленного ЛПС. Для длительного хранения предпочтительными являются флаконы с завинчивающейся крышкой. Аликваты хранили в морозильной камере (-20°C). Лактат кальция приобретали в Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Интраспинальная инъекция ЛПС. Животных помещали в небольшую акриловую клетку, которую соединяли с аппаратом для анестезии, который позволял им свободно дышать в условиях газовой анестезии (2% изофлуран, Spartanburg, SC, USA). После достижения полной анестезии животного его помещали на операционный стол (поддерживая газовую анестезию). Участок для интраспинальной инъекции ЛПС крысам обнажали путем ламинэктомии. В твердой оболочке над левым задним столбом делали два небольших отверстия на расстоянии 1 мм друг от друга. 1 мкл раствора ЛПС осторожно набирали в стерильный шприц Гамильтона и раствор ЛПС медленно вводили путем инъекции в спинной мозг. Шприц оставляли на месте в течение дополнительных 2 мин для предотвращения обратного потока из места инъекции. Затем место инъекции при помощи хирургических зажимов.

Иммуногистохимия. Ткань спинного мозга нарезали на слои толщиной 5 мкм на криостате и окрашивали для гистологического исследования. Изображения получали на микроскопе при 200X увеличении. Для иммуногистохимии срезы блокировали 1% BSA и 10% NGS в 0,05 М PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем подвергали взаимодействию с кроличьим анти-Iba-1 (1:1000, Bioss, MA, USA) при 4°C в течение двух ночей. Систему окрашивания ABC применяли для визуализации микроглии (Iba-1) в срезах (Vector Laboratories, CA, USA).

Результаты.

На фиг. 34 представлена экспериментальная схема установления рассеянного склероза. ОМТ-110 представляет собой лактат кальция.

На фиг. 35 показано восстановление демиелинизированного спинного мозга и снижение инфильтрации микроглии в результате лечения лактатом кальция. Демиелинизация центральной нервной системы и инфильтрация иммунных клеток происходят в связи с воспалением при ряде заболеваний, включая рассеянный склероз и повреждение спинного мозга.

Пример 24.

Направленное воздействие на сосудистые заболевания (атеросклероз, внутримозговое кровоизлия-

ние и инфаркт миокарда).

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при биоцентре Кенгхи (2017-11-0008, South Korea). Пятинедельных самцов крыс линии BALB/c ApoE^{sh1} приобретали в Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение лактата кальция. Лактат кальция приобретали в Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Животная модель сосудистого заболевания. Виды BALB/c ApoE^{sh1} использовали для спонтанного индуцирования сосудистых заболеваний. В указанном исследовании обеспечивали диету с высоким содержанием жира (40%) в течение 4 недель для индуцирования сильного атеросклероза.

Гистологический анализ. Делали поперечный разрез грудной аорты и половину аорты фиксировали в 10% фиксирующем растворе забуференного нейтрального формалина. Затем проводили гистологический анализ. Гистологический анализ осуществляли при окрашивании Н&Е и масляным красным О. Анализировали толщину стенки аорты, площади атеросклеротических бляшек, количество пенных клеток и липидизированные области.

Статистический анализ. Статистический анализ осуществляли с применением программного обеспечения SPSS Statistics и результаты анализировали с применением Т-критерия Стьюдента. Гистологический анализ осуществляли с применением способа Манна-Уитни. P < 0,05 считали статистически значимым.

Результаты.

Количественный анализ результатов гистологического анализа
ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Группа	СРЕДНЯЯ	ПЛОЩАДИ	КОЛИЧЕСТВО	ОБЛАСТИ
	ТОЛЩИНА	АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕС	ПЕНИСТЫХ	ОСАЖДЕНИЯ
	СТЕНКИ	КИХ ОБЛАСТЕЙ (мм ²)	КЛЕТОК	ЛИПИДОВ
	АОРТЫ (мкм)		(клетки/мм ²)	(мм ²)
G1	47,71±2,43	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,00
G2	147,51±23,58*	0,50±0,08*	135,75±31,76*	0,41±0,06*
G3	85,83±8,70 ⁺	0,10±0,03 ⁺⁺	39,00±10,13 ⁺	0,09±0,03 ⁺⁺

Все клинические показатели атеросклероза значительно увеличивались после индуцирования заболевания. Тем не менее, показатели значительно снижались после лечения лактатом кальция.

*: значительная разница между G2 и G1, P < 0,05; ++: значительная разница между G2 и G3,

P < 0,01; +: значительная разница между G2 и G3, P < 0,05.

Данные представляли в виде среднее ± СКО. Результаты статистически анализировали при помощи способов Манна-Уитни.

G1: нормальный контроль (солевой раствор); G2: контроль носителем (солевой раствор); G3: лактат кальция; G2-G3: диета с высоким содержанием холестерина для ApoE-дефицитных мышей (атеросклероз).

Свидетельство направленного воздействия на атеросклероз.

Клинический химический анализ крови
КЛИНИЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРОВИ (мг/дл)

Группа	ОХ	ТГ	ЛПНП	ЛПВП
	G1	113,7±3,0	75,7±1,5	15,0±2,9
G2	2092,4±349,2**	48,6±6,8*	1541,6±30,9**	220,4±11,7**
G3	2328,0±56,7	54,8±2,8	1537,1±14,2	197,2±3,7

Данные представляли в виде среднее±СКО. Статистически анализировали при помощи t-критерия Стьюдента.

** : статистическая разница между G2 и G1, P < 0,01 * : статистическая разница между G2 и G1, P < 0,05,

G1: нормальный контроль (солевой раствор, n=3),

G2: контроль носителем (солевой раствор, n=8),

G3: испытываемое изделие (пентагидрат лактата кальция, n=8),

G2-G3: диета с высоким содержанием холестерина для ApoE-дефицитных мышей.

Патогенные факторы, такие как холестерин (ОХ), холестерин ЛПНП (ЛПНП), триглицериды (ТГ) и холестерин ЛПВП (ЛПВП), не контролировались лактатом кальция. Комбинированная форма кальция с лактатом действует как отдельный ингредиент непосредственно на месте заболевания (см. фиг. 36).

На фиг. 36 представлены репрезентативные гистологические профили тканей аорты. Ткани на левой и правой сторонах изображений окрашены при помощи Н&Е. Ткани на правой стороне изображений окрашены масляным красным для выявления атеросклеротических поражений. Атеросклеротические поражения уменьшались в результате лечения лактатом кальция.

Пример 25.

Направленное воздействие на заболевания пародонта (пульпит и периодонтит).

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (LCDI-2018-0073). Восеминедельных самцов крыс линии Спрега-Доули (SD) приобретали в Samtako Co. (Osan, Gyeonggi-do, Republic of Korea) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF).

Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение липополисахаридов (ЛПС) и лактата кальция. Растворяли 1 мг порошка ЛПС в 100 мкл солевого раствора. Хранили пробирки во льду при применении свежеприготовленного ЛПС. Для длительного хранения предпочтительными являются флаконы с завинчивающейся крышкой. Аликвоты хранили в морозильной камере (-20°C). Лактат кальция приобретали в Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Животная модель заболевания пародонта. Заболевание пародонта индуцировали путем инъекции в десну ЛПС (1 мг/100 мкл) в стерильном солевом растворе. Тонкую иглу для подкожных инъекций вводили в мезиолатеральную сторону первого правого нижнечелюстного моляра и кончик двигали дистально, так что инъекцию осуществляли в межзубный десневой сосочек между первым и вторым молярами. Инъекцию осуществляли медленно и иглу удерживали на месте в течение 10 секунд после инъекции для обеспечения того, чтобы ЛПС не вытекал через след от иглы.

Гистологический анализ. Десну крыс, включая зубы, иссекали и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 2 дней при 4°C. Фиксированные ткани заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 10 мкм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и повторно фиксировали в растворе Буэна в течение 1 ч, удаляли желтую окраску путем промывания проточной водопроводной водой в течение 5~10 мин и окрашивали раствором кислого фуксина с Бибрихом алым в течение 5 мин, а затем в растворе фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот (отношение 1:1) в течение 30 мин и растворе анилинового синего и окрашивали в течение 15 мин. Немного промывали в дистиллированной воде и в 1% растворе уксусной кислоты в течение 2-5 мин. Дегидрировали 95% этиловый спирт, переводили этиловый спирт в абсолютную форму и очищали в ксилоле. Фиксировали с монтирующей средой. Изображения окрашенных тканей получали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Результаты.

На фиг. 37 показано трехцветное окрашивание по Массону тканей пародонта.

Лечение при помощи ЛПС индуцирует заболевание пародонта, которые вызывает сокращение связок и десны вокруг корня зуба (среднее изображение). Связки и десна восстанавливались в результате лечения лактатом кальция (правое изображение), аналогично нормальному контролю (левое изображение).

На фиг. 38 показано трехцветное окрашивание по Массону верхней десны. Верхняя десна вокруг тканей пародонта, которую лечили при помощи ЛПС, демонстрирует аномальную морфологию в результате сильного воспаления (среднее изображение). Морфология верхней десны восстанавливалась в результате лечения лактатом кальция (правое изображение), аналогично нормальному контролю (левое изображение).

Пример 26.

Направленное воздействие на заболевание опорно-двигательного аппарата (ревматоидный артрит)

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при биоцентре Кенгхи (2017-11-0003, South Korea). Шестинедельных самцов мышей линии DBA1/J приобретали в Japan

SLC Inc. (Shizuoka, Japan) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Получение агентов. Два мг/мл коллаген II типа смешивали с таким же объемом полного адьюванта Фрейнда (CFA) для первичного индуцирования ревматоидного артрита. Два мг/мл коллаген II типа смешивали с таким же объемом неполного адьюванта Фрейнда (IFA) для вторичного индуцирования ревматоидного артрита. Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день).

Животная модель ревматоидного артрита.

Первичное индуцирование: 0,1 мл смешанного раствора (коллаген II типа + CFA) вводили путем подкожной инъекции в область на расстоянии 1,5 см от основания хвоста мышей. Место и глубина введения были одинаковыми для всех мышей.

Вторичное индуцирование: через 21 день после первичного индуцирования 0,1 мл смешанного раствора (коллаген II типа + IFA) вводили путем подкожной инъекции в область на расстоянии 1,5 см от основания хвоста мышей. Место и глубина введения были одинаковыми для всех мышей.

Гистологический анализ. Стопы и коленные суставы мышей иссекали, фиксировали (4% параформальдегид) и декальцинировали в течение 2 дней при 4°C. Ткани заключали в парафин и нарезали на слои толщиной 15 мкм. Микропрепараты инкубировали при 55°C в течение 2 ч, а затем депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в градуированной серии растворов этанола и окрашивали раствором кислого фуксина с Бибрихом алым в течение 5 мин, а затем в растворе фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот (отношение 1:1) в течение 30 мин и растворе анилинового синего и окрашивали в течение 15 мин. Немного промывали в дистиллированной воде и в 1% растворе уксусной кислоты в течение 5 мин. Дегидрировали 95% этиловый спирт, переводили этиловый спирт в абсолютную форму и очищали в ксилоле. Фиксировали с монтирующей средой. Изображения окрашенных тканей получали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Результаты.

На фиг. 39 показано трехцветное окрашивание по Массону тканей стопы и коленного сустава. На пальцах ног и коленном суставе наблюдали воспалительный отек в результате ревматоидного артрита (средние изображения). Через 21 день после лечения при помощи CaLa воспалительный отек на пальцах ног и коленном суставе заметно уменьшался (нижние изображения), и они морфологически восстанавливались аналогично нормальному контролю (верхние изображения).

Пример 27.

Направленное воздействие на заболевания пищеварительного тракта (воспалительное заболевание кишечника: болезнь Крона и колит).

Материалы и способы.

Животные. Все эксперименты проводили в соответствии с руководствами по содержанию животных согласно корейскому законодательству (11737, редакция от 5 апреля 2013) и руководствами, установленными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных при университете Гачон (LCDI-2018-0073). Шестинедельных самцов крыс линии Спрега-Доули (SD) приобретали в Samtako Co. (Osan, Gyeonggi-do, Republic of Korea) и разводили в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF). Всех животных содержали при цикле 12-часовой смены дня и ночи при 22-25°C со свободным доступом к пище и воде.

Агенты и животная модель. Для индуцирования болезни Крона и колита индометацин приобретали в Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, USA) и растворяли в солевом растворе. Два мг/кг лактата кальция растворяли в солевом растворе для ежедневной подкожной инъекции (21 день). Использовали две модели воспалительного заболевания кишечника. Болезнь Крона индуцировали путем перорального введения индометацина (7 мг/кг), а колит индуцировали путем подкожных инъекций индометацина (7 мг/кг) ежедневно с интервалами 24 ч (фиг. 40 и 42).

Гистологический анализ. Фиксированные плоские образцы дегидрировали в градуированной серии растворов этанола и заключали в парафин. Парафиновые срезы (толщиной 5 мкм) окрашивали гематоксилином (Merck, Darmstadt, Germany) и эозином (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (H&E) и визуализировали с применением микроскопа Leica DM 1000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Результаты.

На фиг. 40 представлена экспериментальная схема индуцирования болезни Крона.

На фиг. 41 представлены репрезентативные изображения окрашивания H&E при болезни Крона. Наблюдала трансмуральное воспаление и линейное язвообразование в кишечнике после индуцирования болезни Крона (среднее изображение). После четырех недель лечения при помощи CaLa трансмуральное воспаление и линейное язвообразование в тканях кишечника заметно уменьшались (нижние изображения), и они морфологически восстанавливались аналогично нормальному контролю (верхние изображения).

На фиг. 42 представлена экспериментальная схема индуцирования колита.

На фиг. 43 представлены репрезентативные изображения окрашивания H&E при колите. Наблюда-

ли поверхностное язвобразование, полип и воспаление в кишечнике после индуцирования колита (среднее изображение). После четырех недель лечения при помощи CaLa поверхностное язвобразование, полип и воспаление в тканях кишечника заметно уменьшались (нижние изображения), и они морфологически восстанавливались аналогично нормальному контролю (верхние изображения).

Некоторые дополнительные варианты реализации, описанные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются следующими.

А. Способ лечения астмы, фиброза легких, ожирения, гастроэнтерита, хронического воспалительного заболевания кишечника и/или атопического дерматита, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

В. Способ лечения хронической обструктивной болезни легких, пневмонита, кератита, атеросклероза, артериосклероза, миокардита, диабета, ревматоидного артрита, пульпита, периодонтита и/или псориаза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

С. Способ лечения болезни Альцгеймера, инсульта, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени, сепсиса и/или остеопороза, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лактата кальция.

Д. Способ по любому из вариантов реализации А-С, отличающийся тем, что лактат кальция вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

Е. Способ по любому из вариантов реализации А-Д, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию представляют в виде жидкости, порошка, аэрозоля, формы для инъекции, формы для трансфузии жидкости, пластыря, капсулы, пилюли, таблетки, депо или суппозитория.

Ф. Способ по любому из вариантов реализации А-Д, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество лактата кальция в качестве активного агента и фармацевтически приемлемый полисахарид, полимер, липид или их комбинации.

Г. Способ по варианту реализации F, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит лактат кальция и полисахарид. Н. Способ по варианту реализации G, отличающийся тем, что массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет от 1:0,2 до 1:5.

И. Способ по варианту реализации G, отличающийся тем, что массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет 1:0,2. J. Способ по варианту реализации G, отличающийся тем, что массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет от 1:0,2 до 1:5.

К. Способ по любому из вариантов реализации F-J, дополнительно содержащий полимер и/или липид.

Л. Способ по варианту реализации K, дополнительно содержащий полимер и липид, причем массовое отношение полимер к липиду составляет от 1:0,1 до 1:50.

М. Способ по любому из вариантов реализации K-L, причем массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет по меньшей мере 1:5.

Н. Способ по варианту реализации M, отличающийся тем, что массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет от 1:5 до 1:30.

О. Способ по варианту реализации F, содержащий лактат кальция и полимер и/или липид.

Р. Способ по варианту реализации O, содержащий полимер и липид, причем массовое отношение полимера к липиду составляет от 1:0,1 до 1:50. Q. Способ по любому из вариантов реализации O-P, отличающийся тем, что массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет по меньшей мере 1:5.

Р. Способ по любому из вариантов реализации O-Q, причем массовое отношение лактата кальция к полимеру и/или липиду составляет от 1:5 до 1:30.

S. Способ по любому из вариантов реализации O-R, отличающийся тем, что композиция представляет собой композицию короткого действия.

T. Способ по любому из вариантов реализации O-R, отличающийся тем, что композиция представляет собой композицию длительного действия.

U. Способ по любому из вариантов реализации F-T, отличающийся тем, что композиция представляет собой инъекционную композицию.

V. Способ по любому из вариантов реализации F-U, содержащий полисахарид, т.е. производное целлюлозы, пектин, гиалуроновую кислоту, крахмал, гуаровую камедь, хитозан, желатин, коллаген, альгинат, альгиновую кислоту или их комбинации.

W. Способ по любому из вариантов реализации F-V, содержащий полимер, т.е. полоксамер, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) или их комбинации.

X. Способ по любому из вариантов реализации F-W, содержащий липид, т.е. сложный эфир глицерина и моно- или трижирной кислоты или полиэтиленгликоль, сложные эфиры полиэтиленгликоля с растительными маслами, сложные эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, кунжутное масло, соевое

масло, касторовое масло, кукурузное масло, пальмовое масло, арахисовое масло, масло какао, хлопковое масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, миндальное масло, оливковое масло, гидрогенизированное масло, олеиновую кислоту, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту, миристиновую кислоту, каприновую кислоту, каприловую кислоту, лауриновую кислоту, стеариновую кислоту, этилолеат, изопропилпальмитат, октилдодецилмиристант, цетилпальмитат, лауриловый спирт, олеиловый спирт, цетиловый спирт, стеариловый спирт или их комбинации.

Y. Способ по любому из вариантов реализации F-S и U-X, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 40% активного агента высвобождается через 6 ч.

Z. Способ по любому из вариантов реализации F-S и U-Y, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 60% активного агента высвобождается через 12 ч.

AA. Способ по любому из вариантов реализации F-S и U-Z, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 80% активного агента высвобождается через 24 ч.

BB. Способ по любому из вариантов реализации F-S и U-AA, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, по меньшей мере примерно 90% активного агента высвобождается через 48 ч.

CC. Способ по любому из вариантов реализации F-H, J-R и T-X, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 40% активного агента высвобождается через 24 ч.

DD. Способ по любому из вариантов реализации F-H, J-R и T-CC, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 60% активного агента высвобождается через 48 ч.

EE. Способ по любому из вариантов реализации F-H, J-R и CC-DD, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 80% активного агента высвобождается через 72 ч.

FF. Способ по любому из вариантов реализации F-H, J-R и CC-EE, отличающийся тем, что в результате применения композиции в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ испытания на элюирование при 300 об/мин в 200 мл водной среды, имеющей pH 6,8, при 37°C с применением нейлонового фильтра, имеющего размер пор 45 мкм, менее примерно 90% активного агента высвобождается через 144 ч.

GG. Способ по любому из вариантов реализации F-FF, отличающийся тем, что композиция содержится в стерильной емкости из стекла или полиолефина.

HH. Способ по любому из вариантов реализации A-D, отличающийся тем, что лактат кальция покрыт фармацевтически приемлемым кишечнорастворимым покрытием.

II. Способ по варианту реализации HH, отличающийся тем, что кишечнорастворимое покрытие содержит фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP), ацетатфталат целлюлозы (CAP), фталат поливинилацетата (PVAP), шеллак, полимер метакриловой кислоты и ее сложного эфира или их комбинации.

JJ. Способ по любому из вариантов реализации HH-II, причем массовое отношение лактата кальция к кишечнорастворимому покрытию составляет от 10:0,5 до 1:1,5.

KK. Способ по любому из вариантов реализации HH-JJ, отличающийся тем, что в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до pH 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее примерно 20% активного агента высвобождается через 30 мин.

LL. Способ по любому из вариантов реализации HH-KK, отличающийся тем, что в испытании на

растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до pH 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 30% активного агента высвобождается через 60 мин.

ММ. Способ по любому из вариантов реализации НН-LL, отличающийся тем, что в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до pH 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 50% активного агента высвобождается через 120 мин.

NN. Способ по любому из вариантов реализации НН-ММ, отличающийся тем, что в испытании на растворимость *in vitro*, включающем способ USP Paddle при скорости лопастной мешалки 50 об/мин при 37°C, когда композицию помещают в 0,1 н. раствор HCl на 120 мин, а затем доводят до pH 6,8 при помощи фосфатного буфера, менее 10% активного агента высвобождается через 120 мин.

ОО. Способ по любому из вариантов реализации А-В, отличающийся тем, что лактат кальция содержится в пищевой композиции или композиции питательных веществ, содержащих лактат кальция.

РР. Способ по варианту реализации ОО, отличающийся тем, что композиция представляет собой инъекционную пищевую добавку.

Заявка на патент США № 62/616923, поданная 12 января 2018, включена в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки.

Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации настолько полно раскрывает общую природу настоящего изобретения, что другие специалисты, применяя знания в данной области техники, могут легко модифицировать и/или адаптировать его для различных применений, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации охватываются значением и диапазоном эквивалентов описанных вариантов реализации на основе представленных в настоящем документе описания и руководства. Следует понимать, что фразеология или терминология в настоящем документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должна интерпретироваться специалистом в свете представленных учений и руководства.

Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из описанных выше вариантов реализации, приведенных в качестве примера, и должны определяться только в соответствии со следующими пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

Все различные аспекты, варианты реализации и варианты, описанные в настоящем документе, можно комбинировать в любой и во всех вариациях.

Ссылки.

1. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR, "Age-dependent dysregulation of innate immunity," *Nature Reviews Immunol.* 13:875-87 (2013).
2. Sevenoaks MJ, Stockley RA, "Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype", *Respiratory Res.* 7:70 (2006).
3. Hessen M, Akpek EK, "Dry eye: an inflammatory ocular disease," *J. Ophthalmic & Vision Res.* 9:240-50 (2014).
4. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J, "Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases," *Cytokine & Growth Factor Rev.* 19:41-52 (2008).
5. Fornoni A, Ijaz A, Tejada T, Lenz O, "Role of inflammation in diabetic nephropathy," *Current Diabetes Rev.* 4:10-7 (2008).
6. Minghetti L, "Role of inflammation in neurodegenerative diseases," *Current Opinion Neurology* 18:315-21 (2005).
7. Kofler S, Nickel T, Weis M, "Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation," *Clinical Sci.* 108:205-13 (2005).
8. Hotamisligil GS, "Inflammation and metabolic disorders," *Nature* 444:860-7 (2006).

9. Choy EH, Panayi GS, "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis," *New England J. Medicine* 344:907-16 (2001).
10. Mundy GR, "Osteoporosis and inflammation," *Nutrition Rev.* 65:S147-51 (2007).
11. Page RC, Schroeder HE, "Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work," *Laboratory Investigation* 34:235-49 (1976).
12. Tilg H, Moschen AR, "Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease," *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 19:371-9 (2008).
13. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY, "Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis," *J. Clinical Investigation* 94:870-6 (1994).
14. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P, "Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity," *Mediators of Inflammation* 2005:273-9 (2005).
15. Gilroy D, De Maeyer R, "New insights into the resolution of inflammation," *Seminars in Immunology* 27:161-8 (2015).
16. Manabe I, "Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases," *Circulation J.* 75:2739-48 (2011).
17. Fujiwara N, Kobayashi K, "Macrophages in inflammation. Current drug targets," *Inflammation and Allergy* 4:281-6 (2005).
18. Gilmore TD, "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives," *Oncogene* 25:6680-4 (2006).
19. Karin M, "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex," *Oncogene* 18:6867-74 (1999).
20. Taylor CT, "Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation," *J. Physiology* 586:4055-9 (2008).
21. Eltzschig HK, "Carmeliet P. Hypoxia and inflammation," *New England J. Medicine* 364:656-65(2011).
22. Taylor CT, McElwain JC, "Ancient atmospheres and the evolution of oxygen sensing via the hypoxia-inducible factor in metazoans," *Physiology* 25:272-9 (2010).
23. Benizri E, Ginouves A, Berra E, "The magic of the hypoxia-signaling cascade. Cellular and molecular life sciences," *CMLS* 65:1133-49 (2008).

24. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL, "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension," *PNAS USA* 92:5510-4 (1995).
25. Barnes PJ, Karin M, "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases," *New England J. Medicine* 336:1066-71 (1997).
26. Whyte MK, Walmsley SR, "The regulation of pulmonary inflammation by the hypoxia-inducible factor-hydroxylase oxygen-sensing pathway," *Annals of the American Thoracic Society* 11:Suppl. 5:S271-6 (2014).
27. Vadlapatla RK, Vadlapudi AD, Mitra AK, "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases," *Current Drug Targets* 14:919-35 (2013).
28. Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W, "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes," *J. Neuroinflammation* 4:12(2007).
29. Medina J, Arroyo AG, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R, "Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease," *Hepatology* 39:1185-95(2004).
30. Jang JH, Cho YC, Kim KH, Lee KS, Lee J, Kim DE, et al., "BAI, a novel Cdk inhibitor, enhances farnesyltransferase inhibitor LB42708-mediated apoptosis in renal carcinoma cells through the downregulation of Bcl-2 and c-FLIP (L)," *Int. J. Oncology* 45:1680-90 (2014).
31. Narrima P, Paydar M, Looi CY, Wong YL, Taha H, Wong WF, et al, "Persea declinata (Bl.) kosterm bark crude extract induces apoptosis in MCF-7 cells via G0/G1 cell cycle arrest, Bcl-2/Bax/Bcl-xl signaling pathways, and ROS generation," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: (2014).
32. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C, "M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide," *BMC Cancer* 15:577 (2015).
33. Kang S, Park KC, Yang KJ, Choi HS, Kim SH, Roh YJ, "Effect of cediranib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, in a mouse model of choroidal neovascularization," *Clin. Exp. Ophthalmol.* 41:63-72 (2013).
34. Roh YJ, Rho CR, Cho WK, Kang S, "The Antiangiogenic Effects of Gold Nanoparticles on Experimental Choroidal Neovascularization in Mice," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57:6561-67 (2016).
35. Jiao J, Mo B, Wei H, Jiang YR, "Comparative study of laser-induced choroidal neovascularization in rats by paraffin sections, frozen sections and high-resolution optical coherence tomography" *Graefes Arch. Clin. Expt. Ophthalmol.* 251:301-7 (2013).

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Инъекционная фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество лактата кальция в качестве активного агента, фармацевтически приемлемый полимер, липид и фармацевтически приемлемый полисахарид, для лечения хронического воспалительного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, атеросклероза, инсульта, рассеянного склероза, возрастной дегенерации желтого пятна, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), ревматоидного артрита, пульпита, периодонтита, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), повреждения спинного мозга, внутримозгового кровоизлияния, инфаркта миокарда, кератита, фиброза и диабетической ретинопатии,

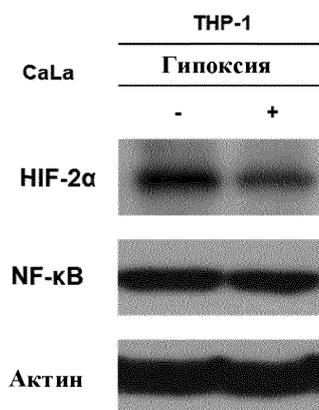
где массовое отношение лактата кальция к полисахариду составляет от 1 : 0,2 до 1 : 5, и массовое отношение лактата кальция к полимеру составляет от 1 : 5 до 1 : 30.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что массовое отношение лактат кальция : полисахарид : липид и полимер составляет 1 : 5 : 30.

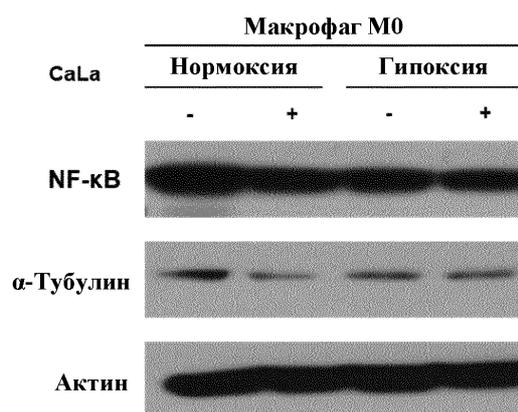
3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что полисахарид представляет собой производное целлюлозы, пектин, гиалуроновую кислоту, крахмал, гуаровую камедь, хитозан, желатин, коллаген, альгинат, альгиновую кислоту или их комбинации.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1, 2, отличающаяся тем, что полимер представляет собой полоксамер, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) или их комбинации.

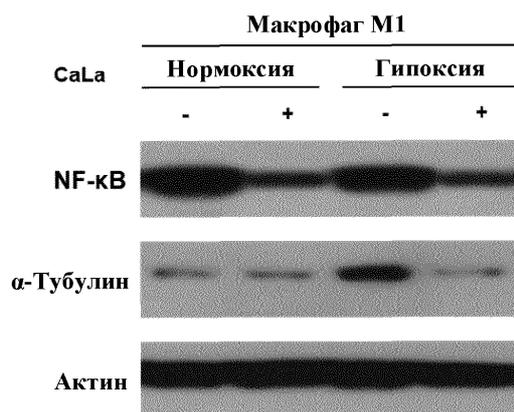
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что липид представляет собой сложный эфир глицерина и моно- или трижирной кислоты или полиэтиленгликоль, сложные эфиры полиэтиленгликоля с растительными маслами, сложные эфиры пропиленгликоля с жирными кислотами, кунжутное масло, соевое масло, касторовое масло, кукурузное масло, пальмовое масло, арахисовое масло, масло какао, хлопковое масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, миндальное масло, оливковое масло, гидрогенизированное масло, олеиновую кислоту, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту, миристиновую кислоту, каприновую кислоту, каприловую кислоту, лауриновую кислоту, стеариновую кислоту, этилолеат, изопропилпальмитат, октилдодецилмиририлат, цетилпальмитат, лауриловый спирт, олеиловый спирт, цетиловый спирт, стеариловый спирт или их комбинации.



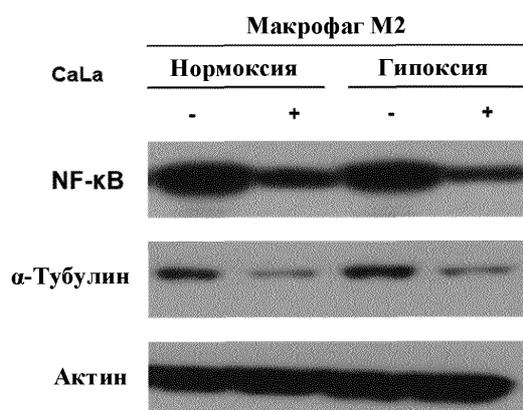
Фиг. 1



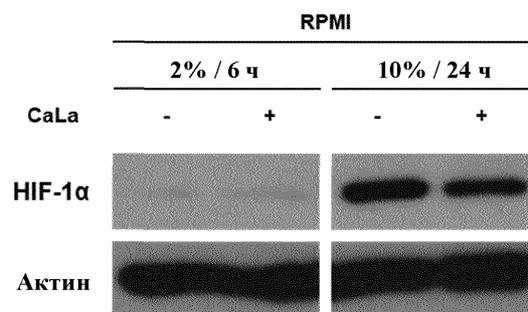
Фиг. 2



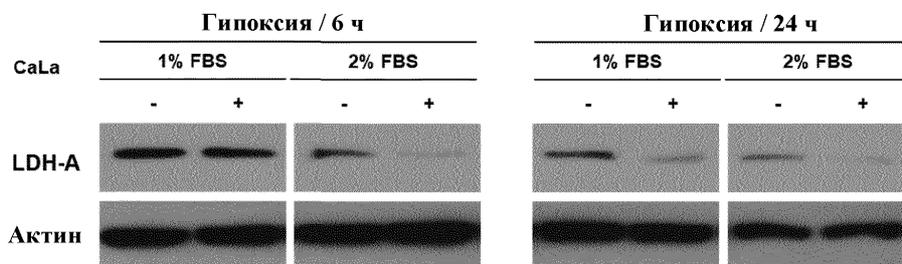
Фиг. 3



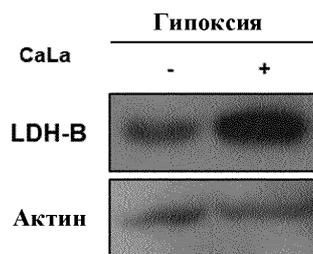
Фиг. 4



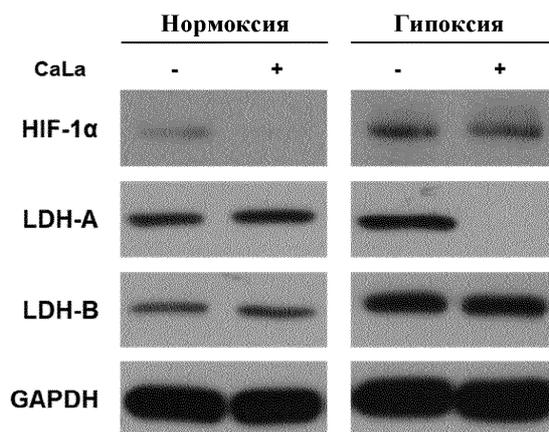
Фиг. 5



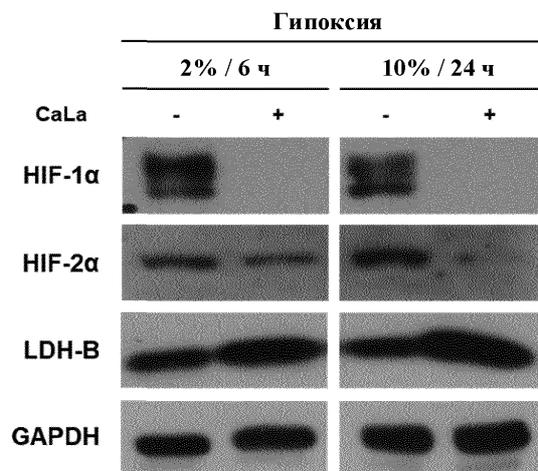
Фиг. 6



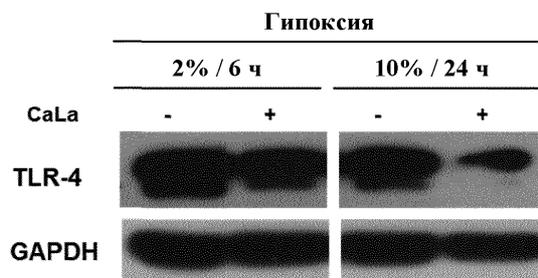
Фиг. 7



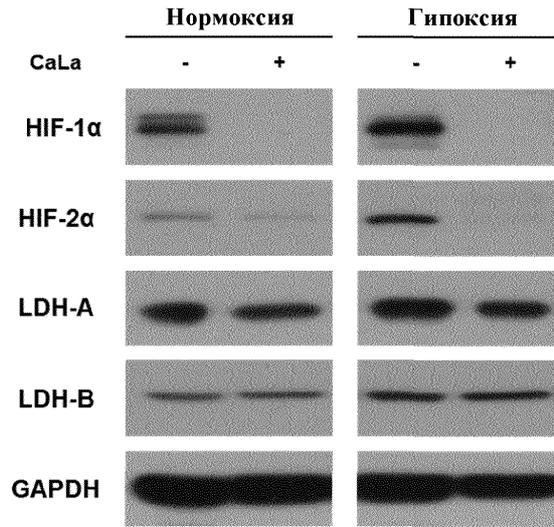
Фиг. 8



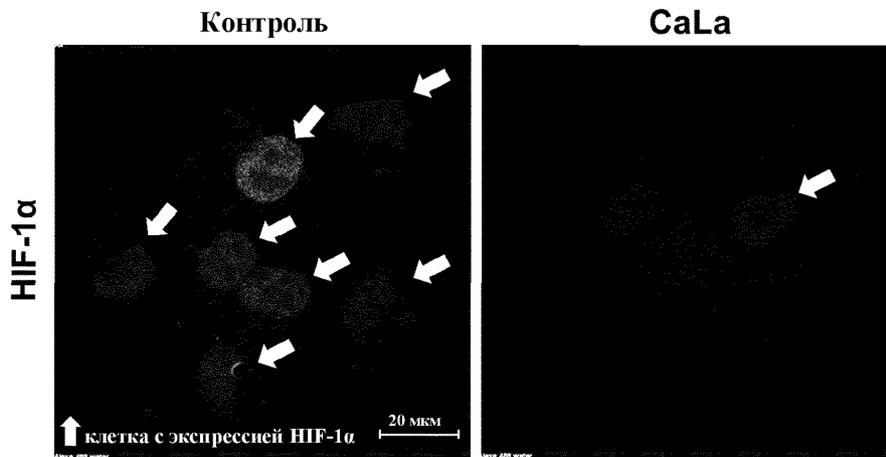
Фиг. 9



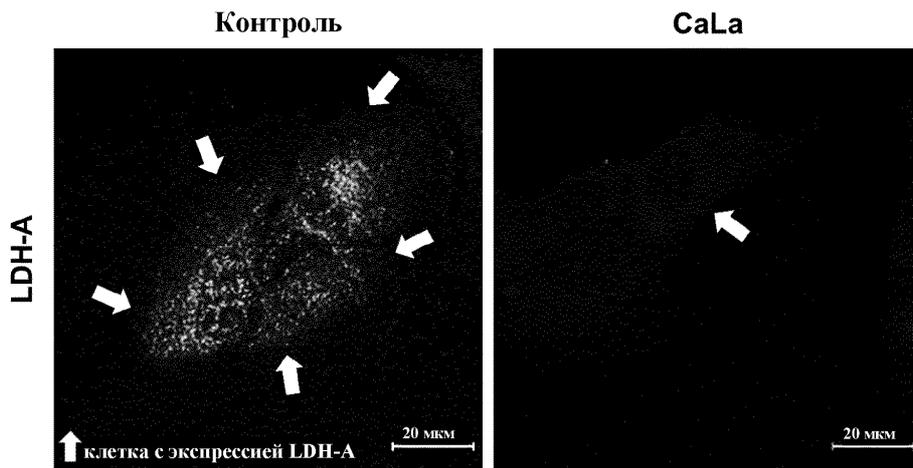
Фиг. 10



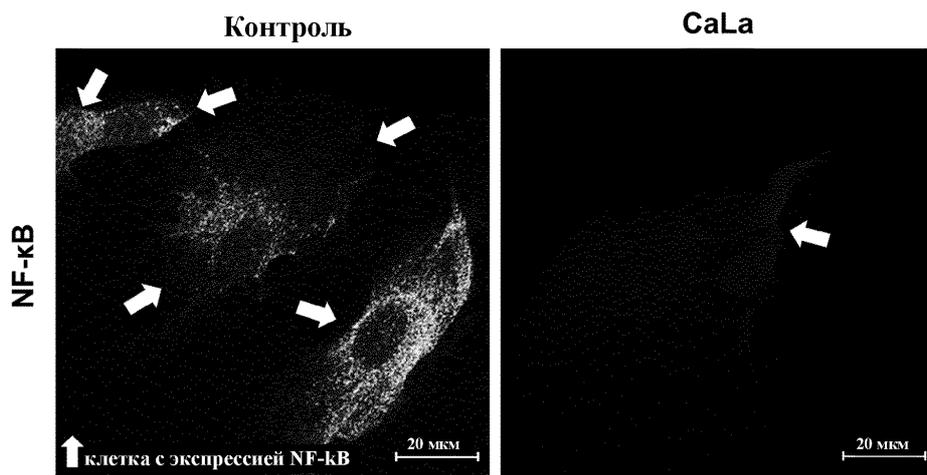
Фиг. 11



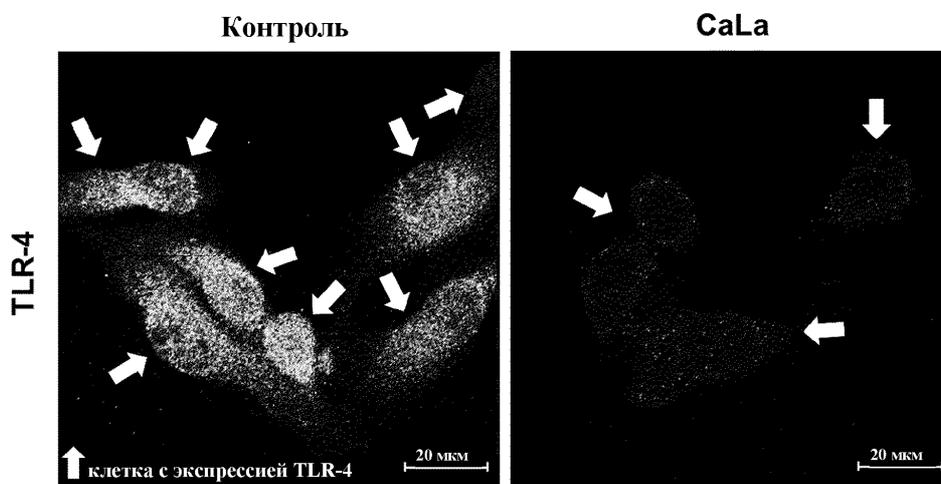
Фиг. 12



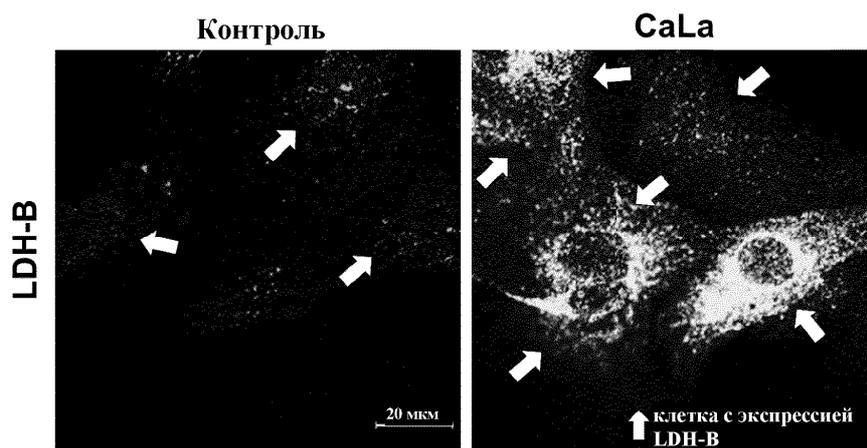
Фиг. 13



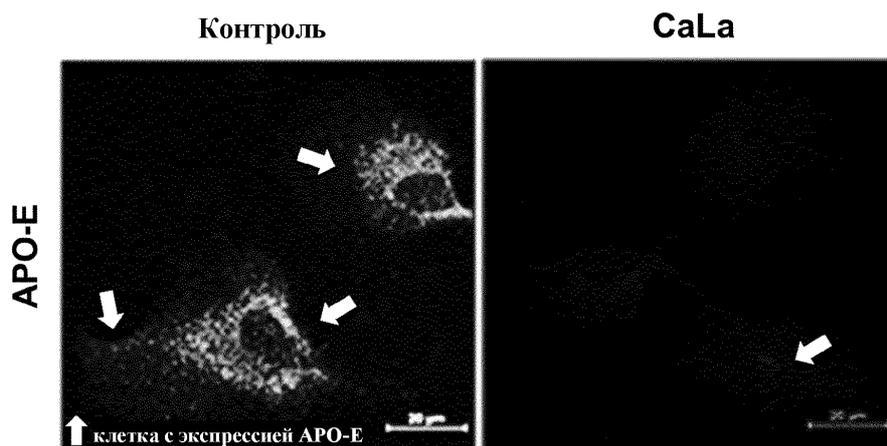
Фиг. 14



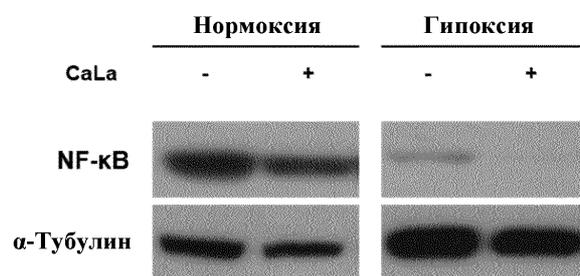
Фиг. 15



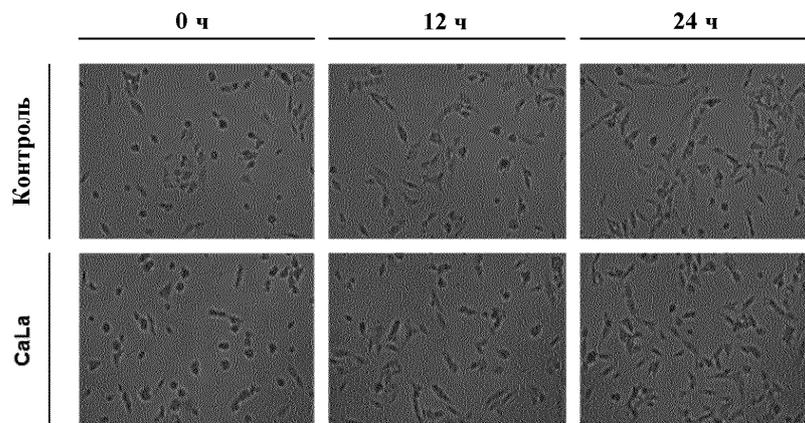
Фиг. 16



Фиг. 17

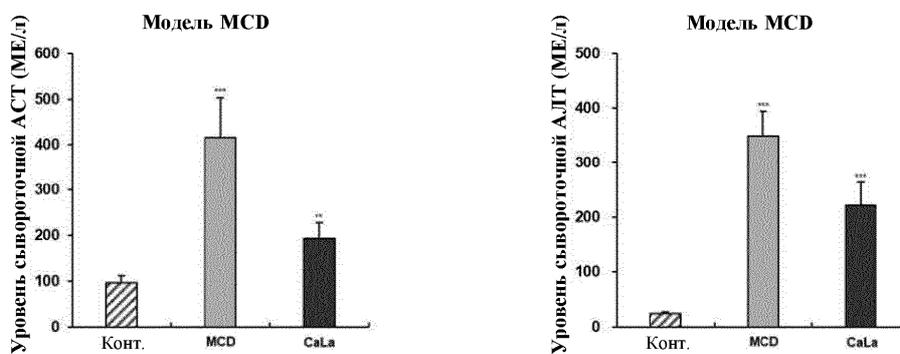


Фиг. 18



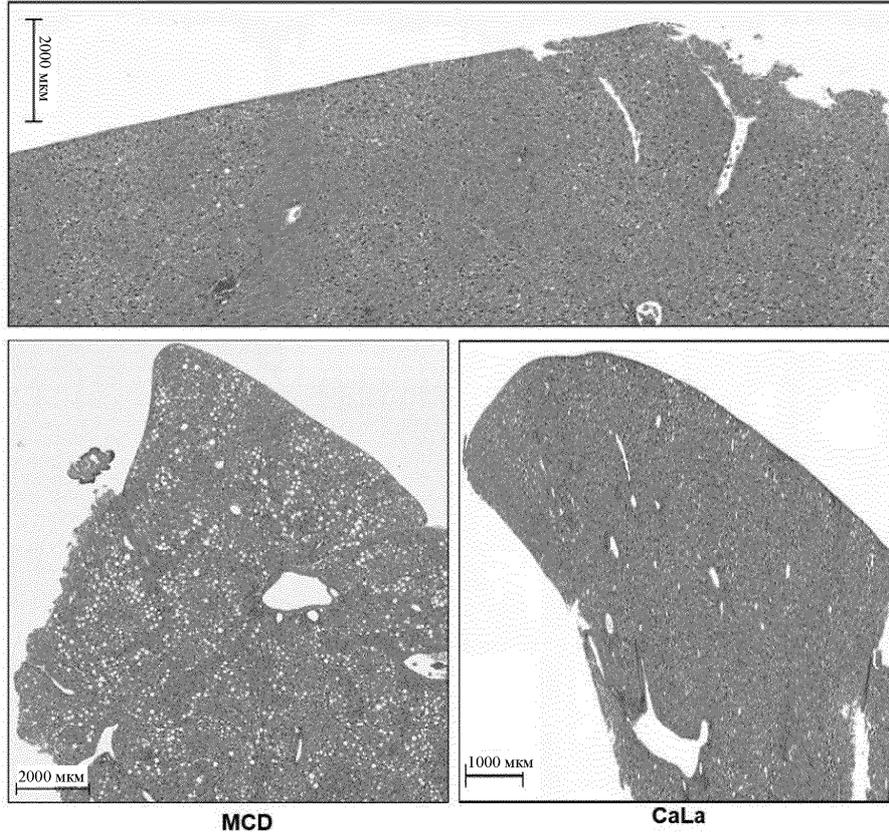
Фиг. 19

[Химический анализ крови] – Липотоксичность

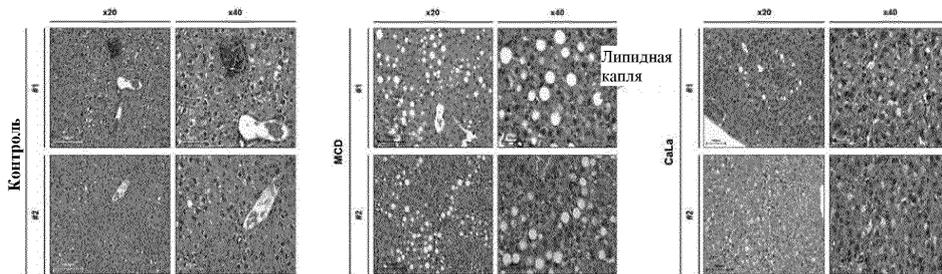


Фиг. 20

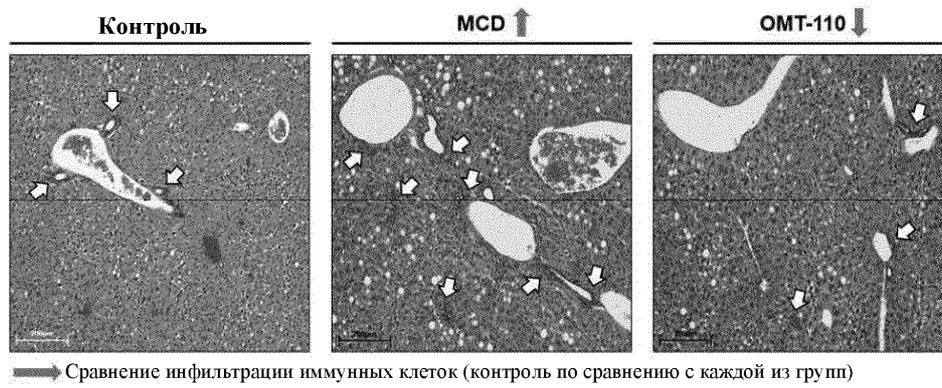
Контроль



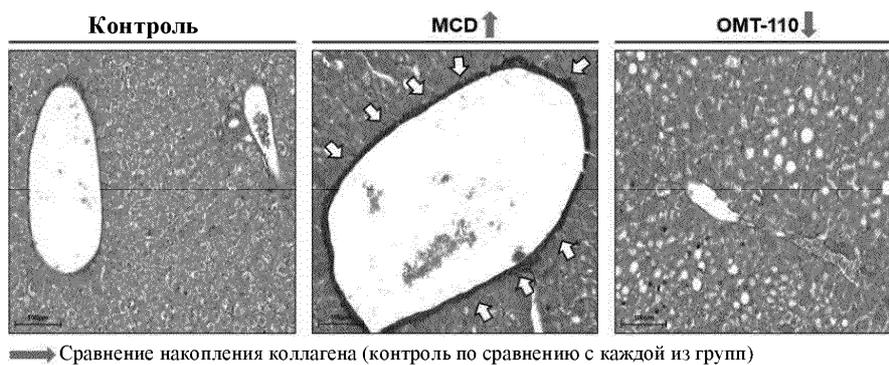
Фиг. 21



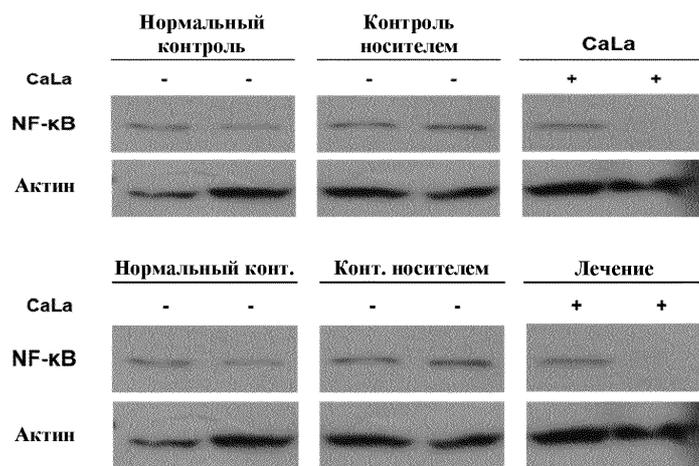
Фиг. 22



Фиг. 23



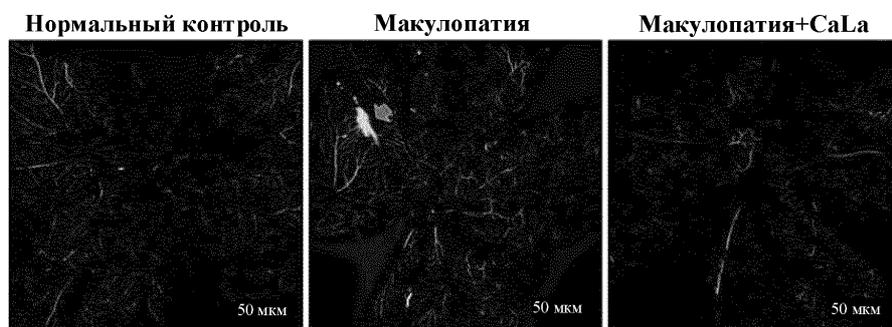
Фиг. 24



Фиг. 25

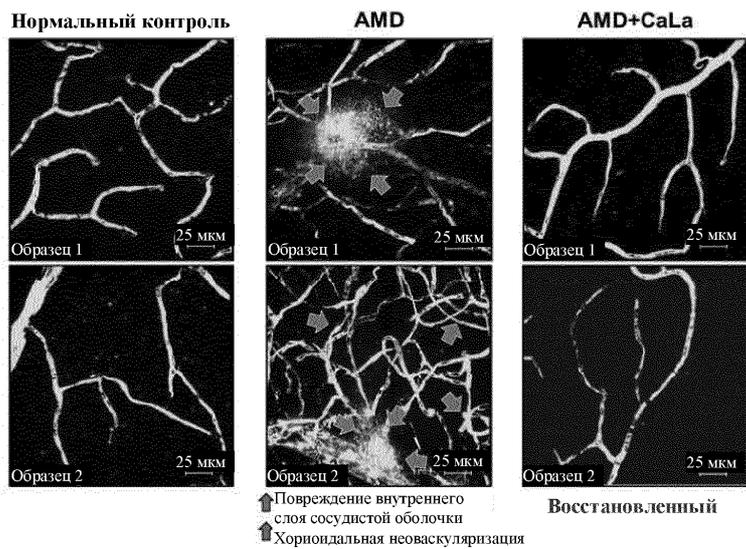


Фиг. 26

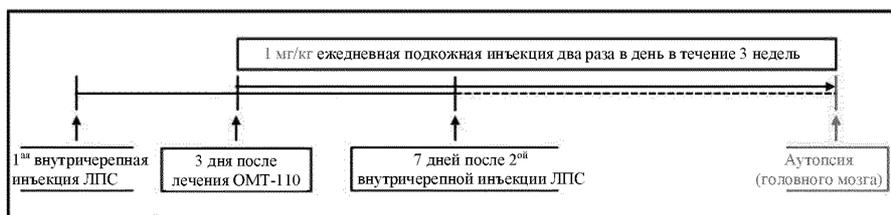


↑ Повреждение внутреннего слоя сосудистой оболочки

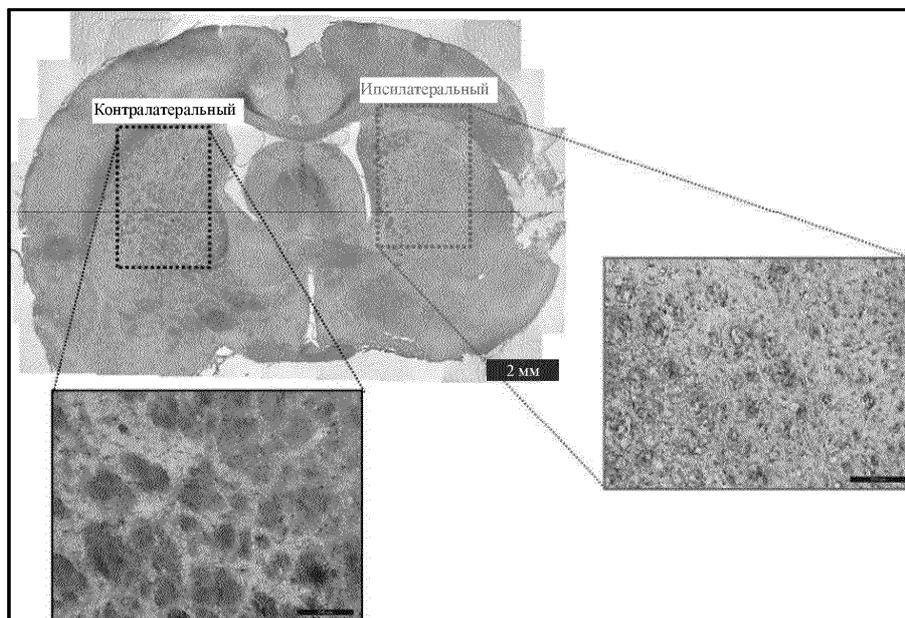
Фиг. 27



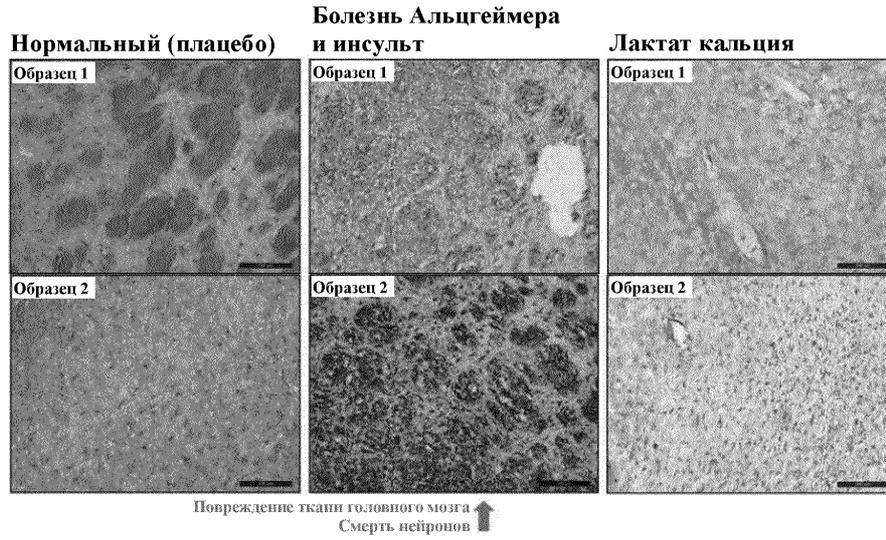
Фиг. 28



Фиг. 29



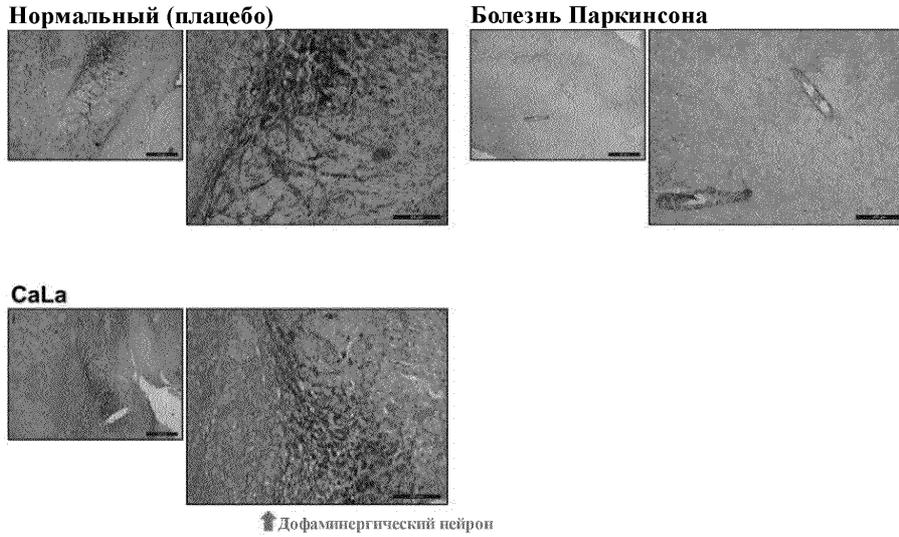
Фиг. 30



Фиг. 31



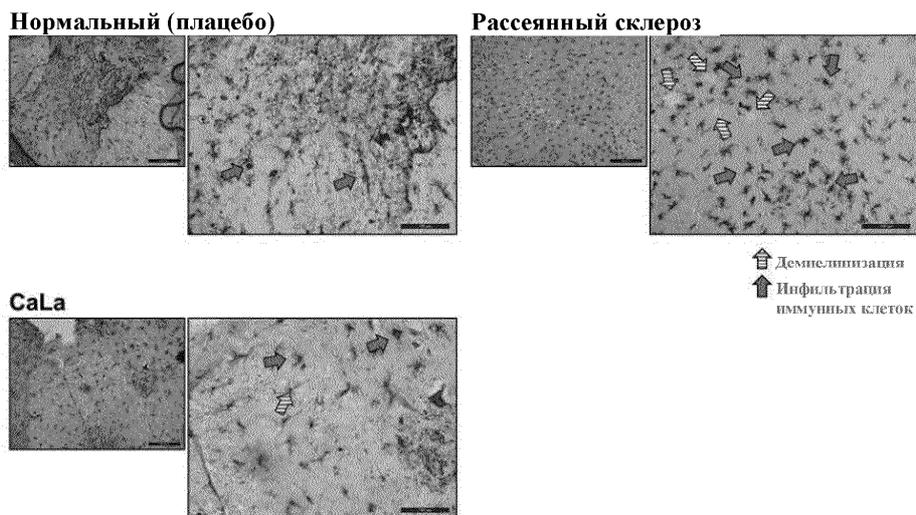
Фиг. 32



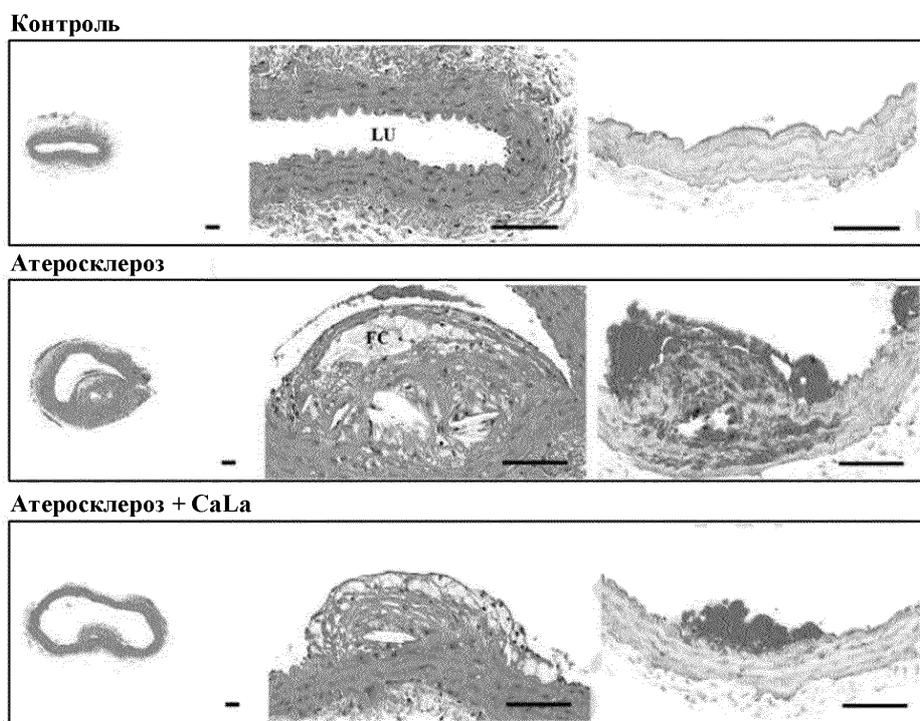
Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36

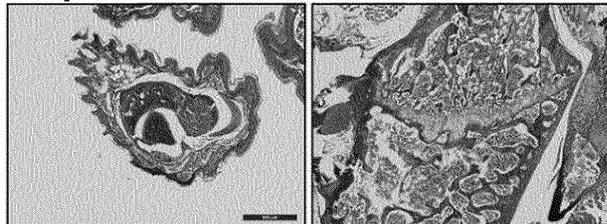


Фиг. 37

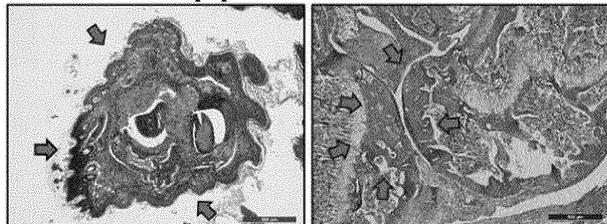


Фиг. 38

Контроль

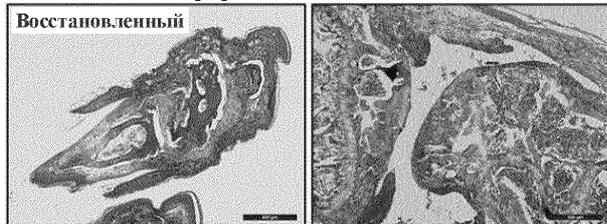


Ревматоидный артрит



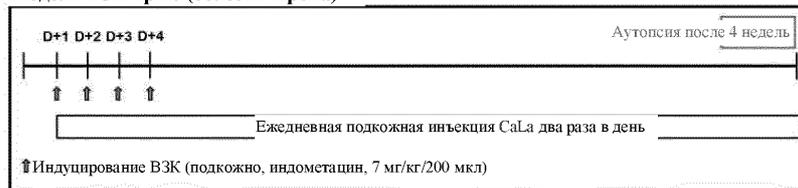
↑ Опухание в результате воспаления

Ревматоидный артрит + CaLa

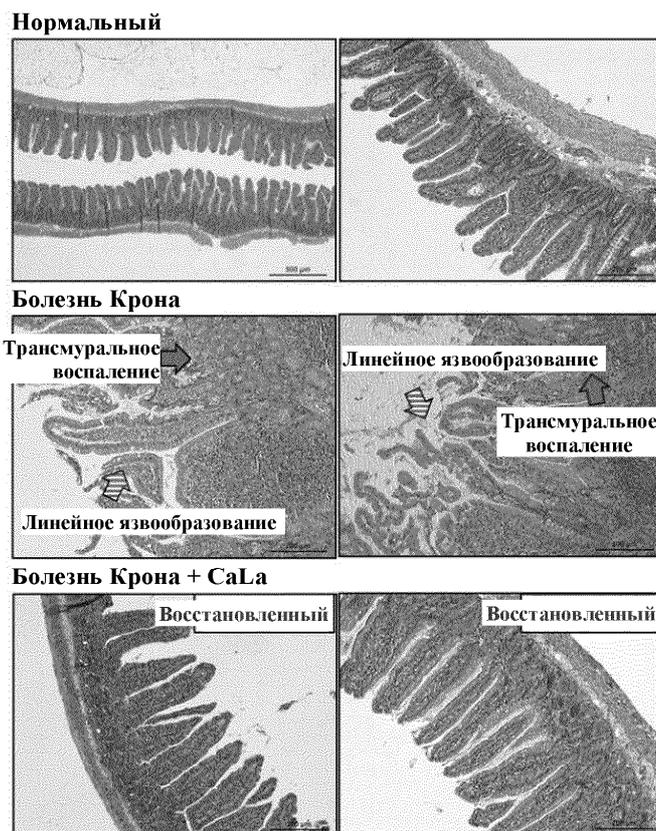


Фиг. 39

Модель ВЗК крыс (болезнь Крона)

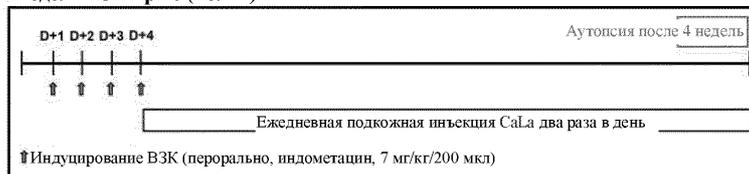


Фиг. 40



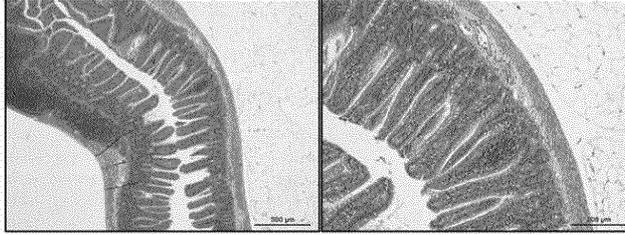
Фиг. 41

Модель ВЗК крыс (колит)

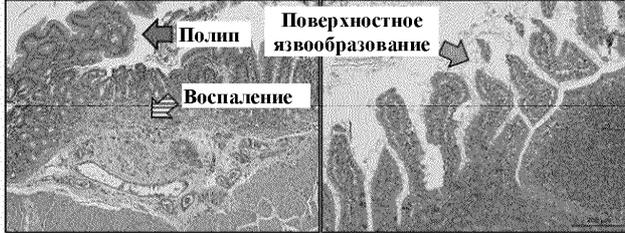


Фиг. 42

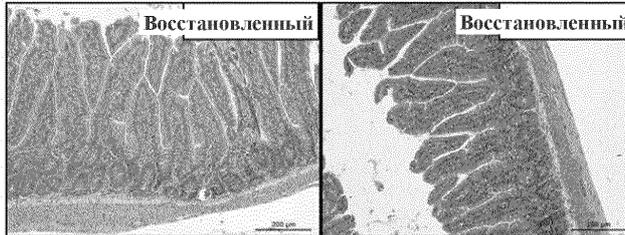
Нормальный



Колит (язвенный)



Колит + CaLa



Фиг. 43