

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490793 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.17(22) Дата подачи заявки
2022.09.30(51) Int. Cl. C07F 9/74 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ГАЛОГЕНИРОВАННОЕ СОЕДИНЕНИЕ ФЕНИЛАРСИНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202111162542.5

(32) 2021.09.30

(33) CN

(86) PCT/CN2022/123419

(87) WO 2023/051805 2023.04.06

(71) Заявитель:
НУО-БЕТА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ТЕКНОЛОДЖИ (ШАНХАЙ) КО.,
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

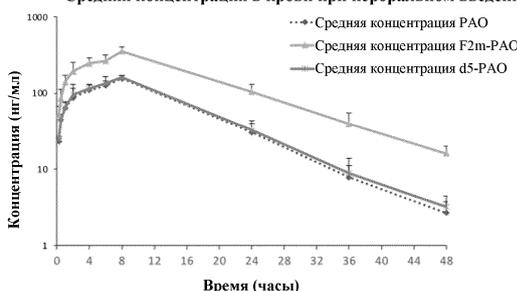
Хуан Фудэ, Хун Фэн, Ван Вэнань,
Чжан Цзяньган, Се Юйюй, Чжан
Хао, Цзяо Чанпин, Цао Лусян, Чжэн
Линань, Хуан Чандэ, Хоу Лицзюань,
Ма Липин, Лу Цзиньянь, Фан Ли,
Ань Пэйюнь (CN)

(74) Представитель:

Бильк А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Фторированный оксид фениларсина или его фармацевтически приемлемая соль, относящиеся к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и фторированный оксид фениларсина. Фторированный оксид фениларсина может быть использован для лечения и предупреждения рака и родственных заболеваний.

Средняя концентрация в крови при пероральном введении



A1

202490793

202490793

A1

PCT/CH2022/123419

МПК:

C07F 9/74 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ГАЛОГЕНИРОВАННОЕ СОЕДИНЕНИЕ ФЕНИЛАРСИНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области химического синтеза и конкретно относится к новому соединению оксида фениларсина и способу его получения и его применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Оксид фениларсина (РАО) является известным биологическим ингибитором, и атом мышьяка в этой молекуле имеет высокую аффинность к атому серы сульфгидрильных групп в биомолекулах. Недавние исследования выявили, что РАО является ингибитором PI4KIII α (фосфатидилинозитол-4-киназа III α) и может быть использован для лечения болезни Альцгеймера. Необходимы дополнительные исследования, чтобы определить, можно ли использовать РАО для лечения других заболеваний. Замещение дейтерием позволяет изменять период полувыведения лекарственного средства, снижать частоту введения и в то же время сохранять первоначальную активность и селективность. Дейтерированные лекарственные средства стали новым направлением исследований и разработки новых лекарственных средств и способа разработки лекарственных средств. В 2017 году Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США одобрило первое в мире дейтерированное лекарственное средство, а именно дейтерированный тетрабеназин (AUSTEDOTM, для лечения болезни Гентингтона и связанной с ней двигательной дисфункции). Несколько дейтерированных лекарственных средств уже вошли в стадию клинических исследований. Тем не менее, все еще требуется дальнейшее исследование с целью определения, будет ли меняться активность *in vivo* и *in vivo* и метаболические свойства *in vivo* модифицированного замещением РАО при замещении атома водорода на бензольном кольце галогеном.

Лучевая терапия является одним из основных средств лечения злокачественных опухолей. Ее основной принцип заключается в том, чтобы с использованием высокоэнергетических лучей разрушать хромосомы раковых клеток, тем самым вызывая некроз раковых клеток (особенно тех, которые растут и делятся) и достигая таким образом результата торможения развития опухолей. Радиация включает α -, β -, γ -лучи, испускаемые

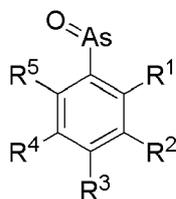
радиоактивными изотопами, и рентгеновские лучи, электронные лучи, пучки протонов и пучки других частиц, создаваемые различными типами рентгеновских аппаратов или ускорителями и т.д. 70% онкологических больных нуждаются в лучевой терапии во время лечения, и 40% раковых заболеваний могут быть вылечены лучевой терапией, поэтому лучевая терапия является средством первого выбора, а также основным средством лечения некоторых типов опухолей, таких как рак полости рта, рак носоглотки, рак пищевода средней стадии, неоперабельный рак легких, рак кожи, ранняя лимфома. Большинство опухолей нервной системы требуют хирургического вмешательства с последующей лучевой терапией. При высокочувствительных к облучению опухолях, таких как злокачественная лимфома, семинома яичка, нефробластома, нейробластома, медуллобластома, мелкоклеточный рак легкого, рак легких на поздних стадиях, рак пищевода и другие виды опухолей, комбинирование с лучевой терапией позволяет значительно повысить терапевтический эффект. Поскольку радиоактивное излучение обладает проникаемостью, она будет вызывать повреждение или некроз нормальных клеток до того, как оно пройдет через нормальные ткани и достигнет раковых клеток, вызывая тем самым различные побочные эффекты, такие как повреждение кожи, рвота, выпадение волос, головная боль, лихорадка, кашель, затрудненное глотание, снижение аппетита, изменения во рту (сухость), диарея, некроз и фиброз тканей, а также снижение показателей периферической крови. Некоторые побочные эффекты исчезают, но некоторые являются длительно или даже постоянно. С одной стороны, побочные эффекты могут повлиять на эффективность лечения и даже привести к неэффективному лечению и, в конечном итоге, к смерти. Таким образом, адъювантная терапия (в том числе лекарственная), проводимая во время лучевой терапии, может защитить нормальные клетки и, следовательно, усилить терапевтический эффект за счет улучшения физического состояния пациента.

В настоящее время в клинической практике в основном применяется амифостин в качестве средства, защищающего нормальные клетки от повреждения, вызываемого терапией опухоли. Под действием щелочной фосфатазы в тканях амифостин теряет фосфорную кислоту и становится свободным тиоловым метаболитом с фармакологической активностью, что позволяет снизить токсичность, вызываемую лучевой терапией и химиотерапией. Тем не менее, его применение ограничено несколькими видами рака, сведения, касающиеся его защитного действия от повреждения, вызванного лучевой терапией, также ограничены, и его применение вызывает множество побочных эффектов. Поэтому острой задачей является поиск более безопасного и эффективного протектора нормальных клеток, чтобы повысить эффективность терапии

опухолей.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль:



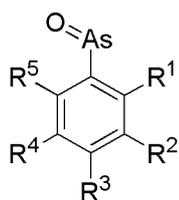
Формула (I)

где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 независимо выбраны из водорода, дейтерия, фтора, хлора, брома, йода, метила, amino, нитро, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, монофторметила, дифторметила или трифторметила, и по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляет собой галоген или дейтерий.

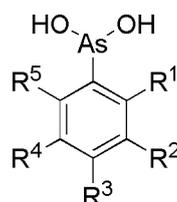
Предпочтительно, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 независимо выбраны из водорода, дейтерия, фтора, хлора, брома, метила, amino, нитро, монофторметила, дифторметила или трифторметила, и по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляет собой фтор или является фторированным.

В одном из воплощений R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 независимо выбраны из водорода, дейтерия или галогена, и по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляет собой галоген, по меньшей мере два из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляют собой галогены, предпочтительно по меньшей мере один из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляет собой фтор, предпочтительно по меньшей мере два, три, четыре или пять из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляют собой фтор.

В одном из воплощений соединение формулы (I) возможно образует соединение формулы (I') при растворении в растворителе, в частности в водном растворителе, где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 имеют такое же значение, как описано выше.

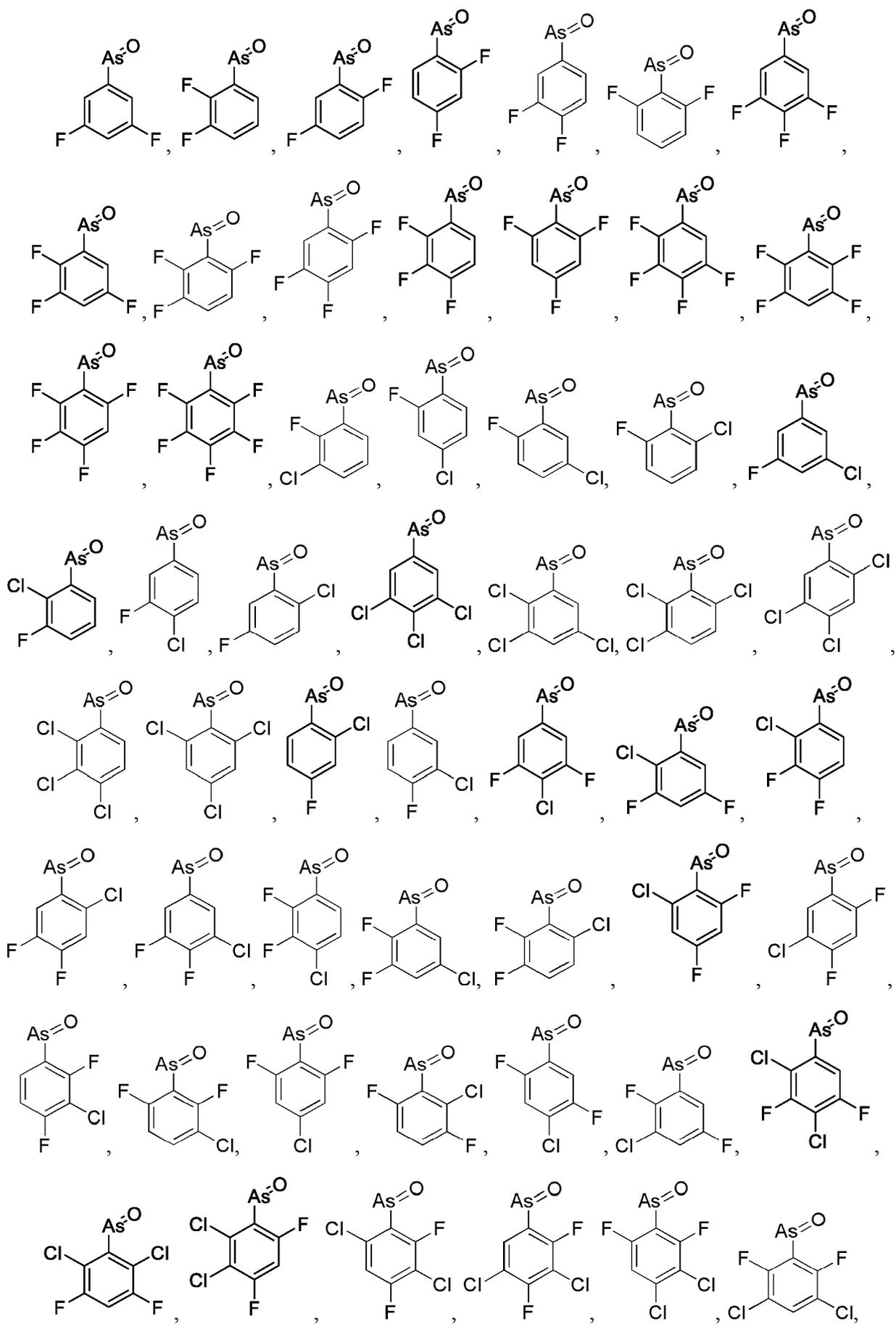


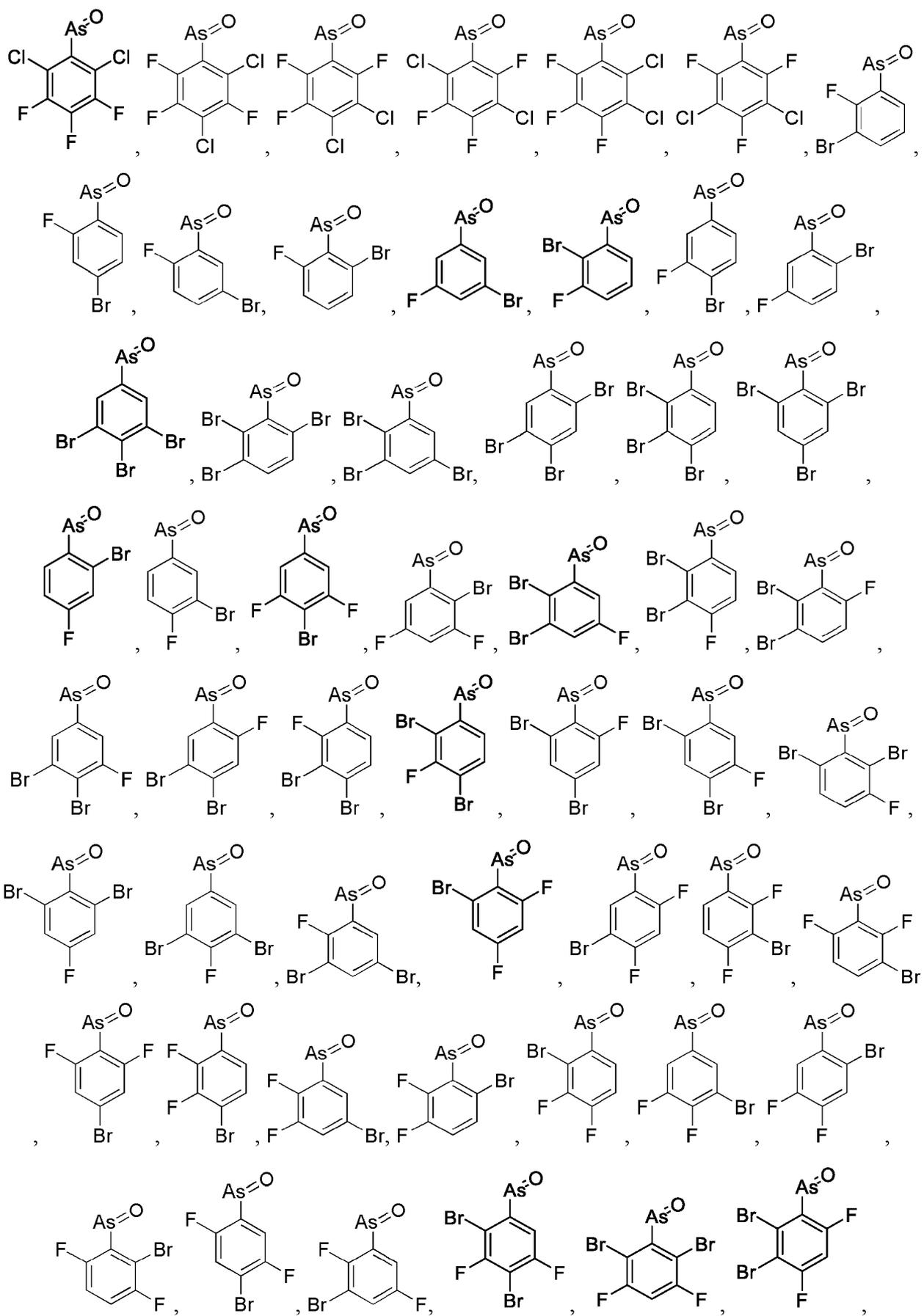
Формула (I)

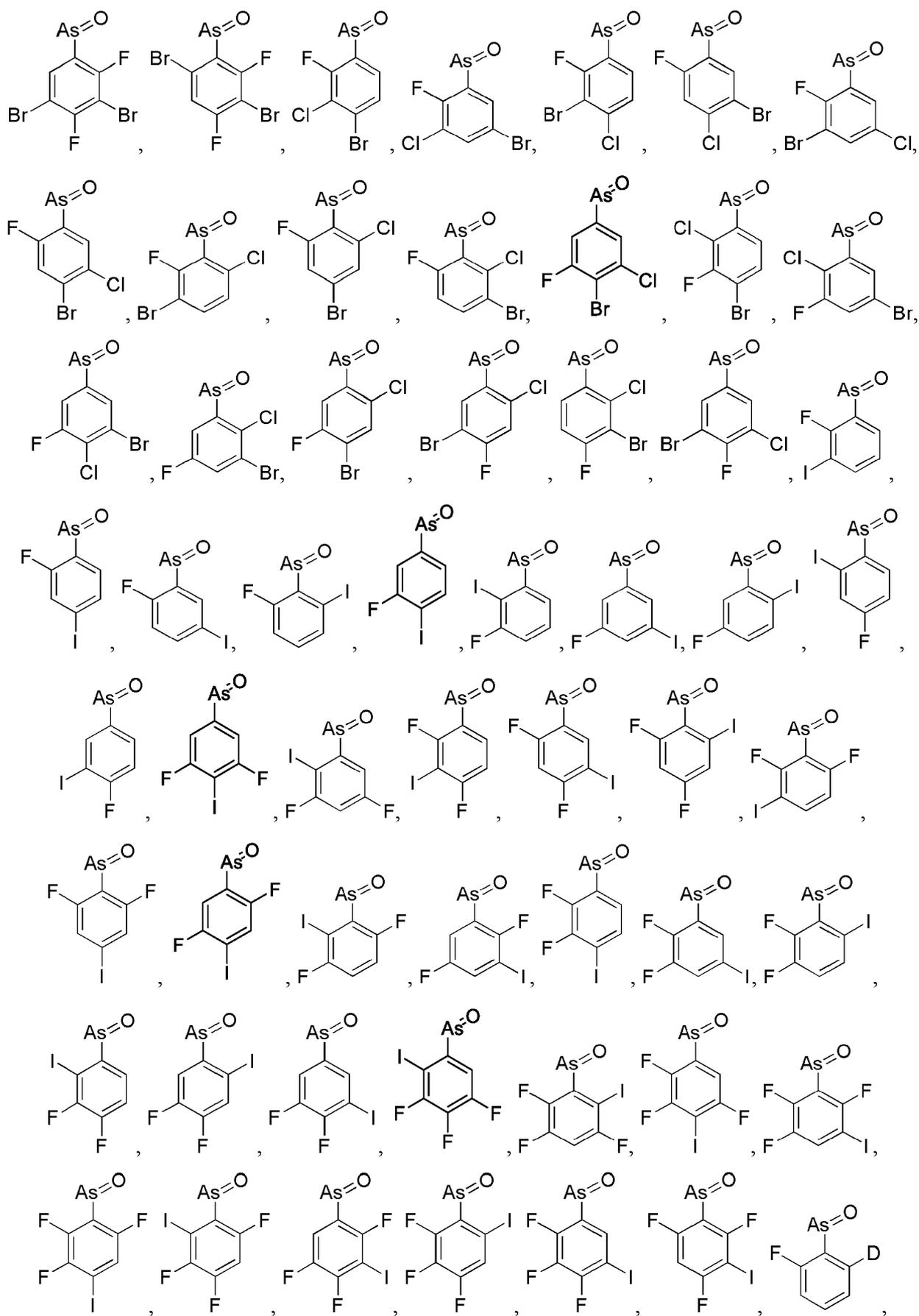


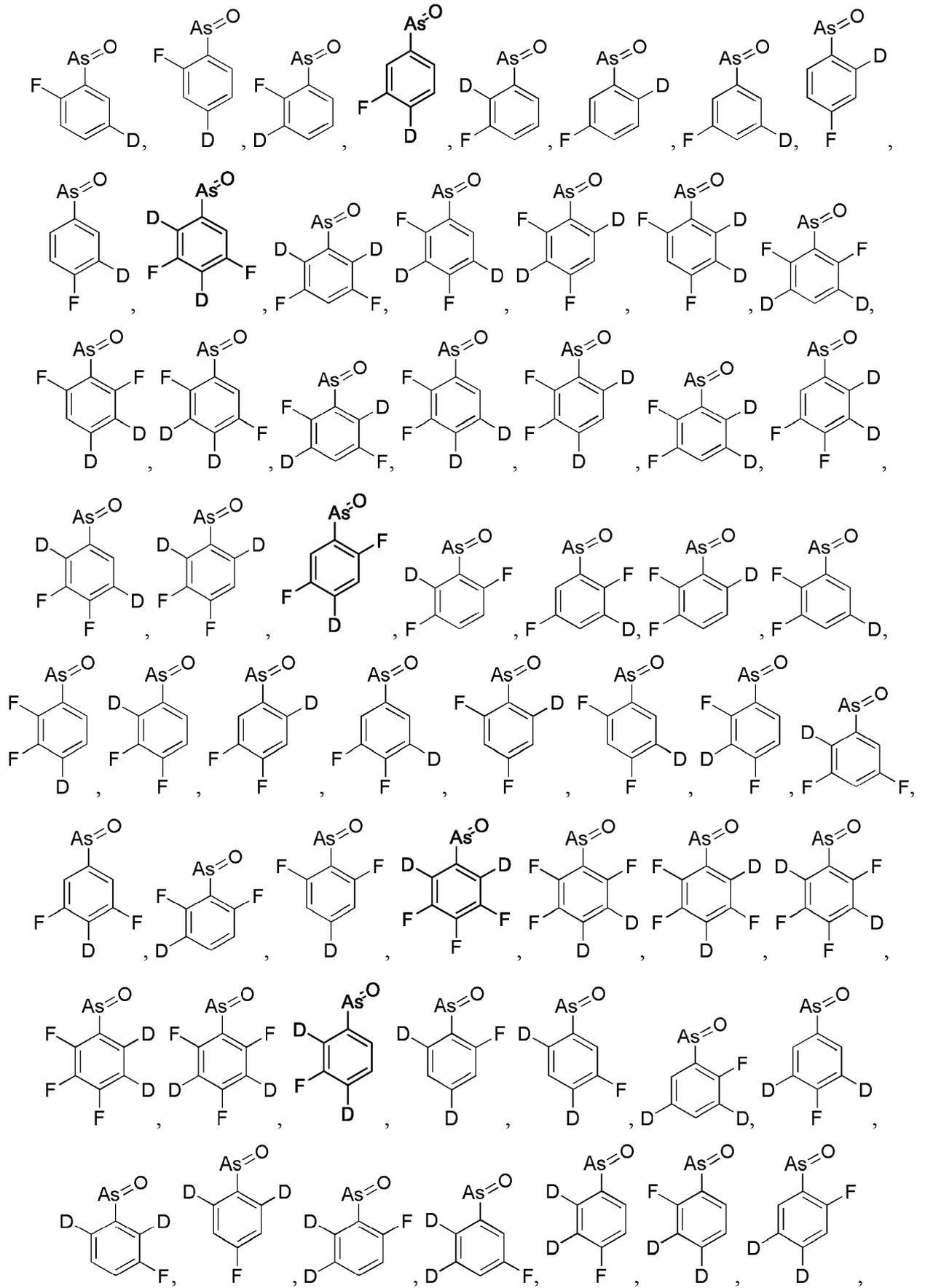
Формула (I')

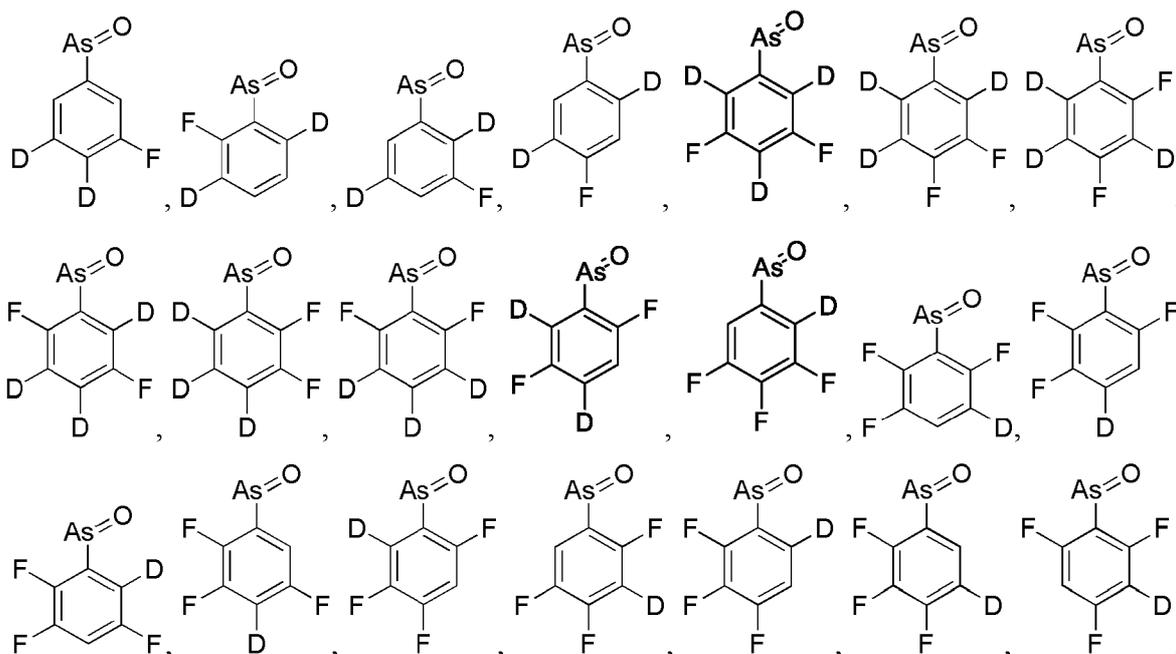
В одном конкретном воплощении соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:











В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания или патологической реакции у субъекта.

В одном из воплощений заболевание выбрано из по меньшей мере одного из опухоли, злокачественного заболевания, такого как злокачественная опухоль или злокачественное заболевание, вызванное химиотерапевтическим лекарственным средством для лечения опухоли, болезни Альцгеймера, заболевания, связанного с неправильной внутриклеточной укладкой белка, лизосомной болезни накопления, воспалительной реакции, фиброза тканей или органов, вирусных заболеваний, невроза, микробной инфекции, такой как инфицирование лекарственно-устойчивыми микроорганизмами, повреждения клеточной ткани в результате воздействия радиации, атеросклероза, диабета и астмы.

В одном из воплощений субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком.

В одном конкретном воплощении опухоль выбрана из лимфом (например, острой не-B- или не-T-клеточной лимфомы), рака шейки матки, рака эндометрия, рака печени, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого или мелкоклеточного рака легкого), колоректального рака, рака желудка, рака кожи (например, меланомы), рака кости, остеосаркомы, миеломы, рака крови (например, острого или хронического лейкоза), рака яичника, опухоли предстательной железы, опухоли головного мозга (например,

церебральной астроцитомы), нейробластомы, рака щитовидной железы, злокачественной эмбриональной рабдомиосаркомы.

В одном конкретном воплощении заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка, представляет собой болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию, миозит с тельцами-включениями, лобно-височную деменцию, болезнь Гентингтона, полиглутаминовую болезнь, боковой амиотрофический склероз или прионную болезнь.

В одном конкретном воплощении лизосомная болезнь накопления представляет собой нарушение метаболизма сфинголипидов, такое как болезнь Гоше, болезнь Ниманна типа С, мукополисахаридоз, болезнь накопления гликогена, болезнь накопления гликопротеинов, болезнь накопления липидов, дефекты посттрансляционной модификации, расстройство делеции внутреннего мембранного белка, нейрональный восковидный липофузинос или нарушение функции органелл, связанное с лизосомами.

В одном конкретном воплощении воспалительная реакция представляет собой повышение уровня воспалительных факторов, таких как TNF α (фактор некроза опухоли альфа) или IL-6 (интерлейкин-6) в локальной ткани или в крови по всему организму. Воспалительная реакция представляет собой воспалительную реакцию, вызванную патогенами, такими как бактерии, грибы, вирусы или паразиты, или воспалительная реакция представляет собой воспалительную реакцию, вызванную факторами, не являющимися патогенами, такими как опухоли, аллергены, повреждение и т.д.

В одном конкретном воплощении фиброз ткани или органа выбран из фиброза сердца, фиброза почек, фиброза легких, фиброза печени, фиброза в ходе заживления раны, или рестеноза из-за образования рубцов, или фиброза после установки артериального стента.

В одном конкретном воплощении вирус включает коронавирус и вирус, не являющийся коронавирусом, предпочтительно коронавирус выбран из вируса инфекционного бронхита курицы, вируса эпидемической диареи свиней, вируса инфекционного гастроэнтерита свиней, вируса гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней, δ -коронавируса свиней, респираторного коронавируса собак, вируса мышинового гепатита, коронавируса кошек, коронавируса человека, вируса папилломы человека, вируса тяжелого острого респираторного синдрома, вируса ближневосточного респираторного синдрома или нового коронавируса; вирус, не являющийся коронавирусом, выбран из вируса гепатита С или ВИЧ (вирус иммунодефицита человека).

В одном конкретном воплощении невроз выбран из неврастении, тревоги, депрессии или мании.

В одном из воплощений повреждение клеточной ткани, вызванное воздействием радиации, выбрано из структурных и функциональных изменений в нормальных клетках, тканях и органах в участке облучения, например повреждение нормальных клеток или некроз, вызванное(ый) α -, β -, γ -лучами, излучаемыми радиоактивными изотопами, рентгеновскими лучами, создаваемыми различными рентгеновскими аппаратами, или генерируемыми ускорителями рентгеновскими лучами, пучками электронов пучками, пучками протонов или пучками других частиц и т.д., например повреждение клеток, тканей и органов, вызванное облучением рентгеновскими лучами.

В одном из воплощений микробная инфекция выбрана из бактериальной или грибковой инфекции, предпочтительно лекарственно-устойчивой бактериальной инфекции или лекарственно-устойчивой грибковой инфекции; более предпочтительно, где микроорганизм выбран из *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium tetani*, *Propionibacterium acnes*, *Cryptococcus neoformans*, *Helicobacter pylori*, *Bacterioides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Trichomonas vaginalis*, и по меньшей мере одного из их лекарственно-устойчивых организмов; или, предпочтительно, микробная инфекция выбрана из микроорганизма, инфицирующего поверхность тела или участок слизистой оболочки, такой как участок появления угревой раны, прыща, раны, ожога или ошпаривания.

В одном из воплощений симптомом повреждения клеточной ткани в результате воздействия радиоактивного излучения является снижение слюноотделения, сухость во рту, мукозит, вызванный повреждением слюнных желез, вызванным рентгеновским излучением, и лейкопения, вызванная рентгеновским излучением.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания у субъекта, дополнительно включающее введение второго реагента нуждающемуся в этом субъекту. Согласно настоящему изобретению предложено применение вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации со вторым реагентом в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания у субъекта.

В одном из воплощений заболевание выбрано из опухоли, и второй реагент

предназначен для лечения опухолей.

В одном из воплощений лекарственное средство для лечения опухолей предпочтительно выбрано из антинеопластического агента, препятствующего митозу, такого как паклитаксел или альбумин-паклитаксел, лекарственного средства, воздействующего непосредственно на структуру и функцию ДНК, такое как карбоплатин или цисплатин, или ингибитора KRAS (вирус крысиной саркомы Кирстена).

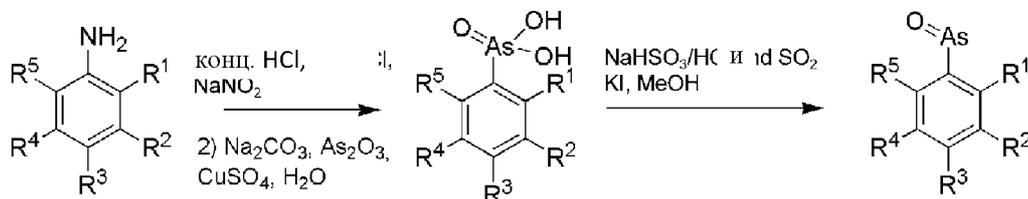
В одном конкретном воплощении заболевание выбрано из фиброза легких, и второй реагент предназначен для лечения фиброза легких.

В одном из воплощений вышеуказанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят до, после или одновременно со вторым реагентом.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая вышеуказанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из воплощений фармацевтическая композиция дополнительно содержит лекарственное средство, применяемое для лечения опухолей.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, включающий следующие стадии:



1) добавление концентрированной соляной кислоты и водного нитрита натрия в водный раствор анилина, имеющего структуру формулы (I), или его соли при 0°C-10°C и поддержание температуры ниже 5°C;

2) нагревание водного раствора карбоната натрия, триоксида мышьяка и сульфата меди до 90-100°C и затем охлаждение этого водного раствора, добавление раствора, приготовленного на стадии 1), в этот водный раствор, перемешивание, фильтрование, добавление кислоты в фильтрат для корректировки pH и выделение выпавшего в осадок твердого вещества;

3) перемешивание вышеуказанного выпавшего в осадок твердого вещества, йодида калия, бисульфита натрия или соляной кислоты и диоксида серы в метаноле до завершения реакции и последующая обработка с получением указанного соединения.

В одном из воплощений последующая обработка на стадии 3) включает доведение pH до соответствующего значения кислотой или основанием, экстрагирование

этилацетатом, объединение органических фаз и упаривание досуха.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения фиброза ткани или органа, такого как фиброз сердца.

Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения повреждения клеточной ткани, вызванного воздействием радиации, у пациента с опухолью.

Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения атеросклероза или вызванного атеросклерозом заболевания, где вызванное атеросклерозом заболевание предпочтительно представляет собой коронарную болезнь сердца, сердечный приступ или церебральный инфаркт.

Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения диабета у пациента с опухолью.

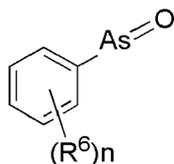
Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения микробной инфекции, где микробная инфекция выбрана из бактериальной или грибковой инфекции, предпочтительно лекарственно-устойчивой бактериальной инфекции или лекарственно-устойчивой грибковой инфекции; более предпочтительно, где микроорганизм выбран из *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium tetani*, *Propionibacterium acnes*, *Cryptococcus neoformans*, *Helicobacter pylori*, *Bacterioides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Trichomonas vaginalis*, и по меньшей мере одного из их лекарственно-устойчивых организмов; или, предпочтительно, микробная инфекция выбрана из микроорганизма, инфицирующего поверхность тела или участок слизистой оболочки, например участок появления угревой раны, прыща, раны, ожога или ошпаривания.

Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения астмы.

Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения неалкогольного стеатогепатита.

В одном из воплощений, где оксид фениларсина и его производное представляют собой антитело, низкомолекулярное соединение, молекулу РНК-интерференции или антисмысловую нуклеиновую кислоту, антитело предпочтительно представляет собой

моноклональное или поликлональное антитело, более предпочтительно антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело; молекула РНК-интерференции предпочтительно представляет собой короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК), предпочтительно молекула РНК-интерференции имеет длину 18-100 оснований и/или молекула РНК-интерференции модифицирована для повышения ее стабильности; низкомолекулярное соединение предпочтительно представляет собой оксид фениларсина или его производное, G1 и его аналог, A1 и его аналог (J Med Chem 2014 Vol. 57 Issue 5 Pages 2091-106 и J Biol Chem 2014 Vol. 289 Issue 9 Pages 6120-32), или симепивир и его аналог (Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. 96, No. 4, pp. 867e876, 2016), TG-1478 (Tyrphostin AG-1478, NSC-693255), более предпочтительно оксид фениларсина и его производное имеет структуру формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль:



Формула (II),

где каждый R^6 независимо выбран из (а) водорода, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксила, amino, карбамоила, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C2-6-алкинила, C2-6-алкенила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, C1-6-алкилен-NH₂, C1-6-алкилен-NH-C(O)H, -As(O), -N=NH, N-(C1-6-алкил)амино, N,N-(C1-6-алкил)₂амино, -NH-C(O)H, -NH-S(O)₂H, -C(O)OH, -OC(O)H, -SH, -S(O)₂H, -S(O)₂-NH₂ или гетероциклила, который возможно замещен R^7 или R^8 , где R^7 и R^8 , каждый независимо, выбраны из amino, C1-6-алкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, N-(C1-6-алкил)амино, N-(6-12-членный-арил)амино, N,N-(C1-6-алкил)₂амино, C3-6-циклоалкила, 6-12-членного арила или 3-12-членного гетероциклила, который возможно замещен одним или более чем одним галогеном, нитро, циано, гидроксилом, amino, карбамоилом, -NH-C(O)-R¹⁰, -C(O)OR⁹, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилем, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или Vn-O-, и R⁹ представляет собой C1-6-алкил, который возможно замещен одним или более чем одним галогеном, нитро, циано, гидроксилом, amino, карбамоилом, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилем, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или Vn-O-, и R¹⁰ выбран из H, C1-6-алкила,

C2-6-алкинила, C2-6-алкенила, C1-6-алкоксила или C1-6-галогеналкила, и/или

(b) R^6 на двух соседних атомах углерода образует 5-12-членный циклоалкил, арил или гетероциклил, который возможно замещен одним или более чем одним галогеном, нитро, циано, гидроксилом, амино, карбамоилом, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилем, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или $Bn-O-$,

где n представляет собой целое число от 0 до 5.

В одном из воплощений, где n представляет собой целое число от 0 до 2, каждый R^6 независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксила, амино, карбамоила, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, $-As(O)$, $N-(C1-6-алкил)амино$, $N,N-(C1-6-алкил)_2амино$, $-NH-C(O)H$ или $-NH-S(O)_2H$, который возможно замещен R^7 или R^8 .

В одном из воплощений, где n представляет собой целое число от 0 до 2, каждый R^1 независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксила, амино, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, $-As(O)$, $-NH-C(O)H$ или $-NH-S(O)_2H$, который возможно замещен R^7 или R^8 .

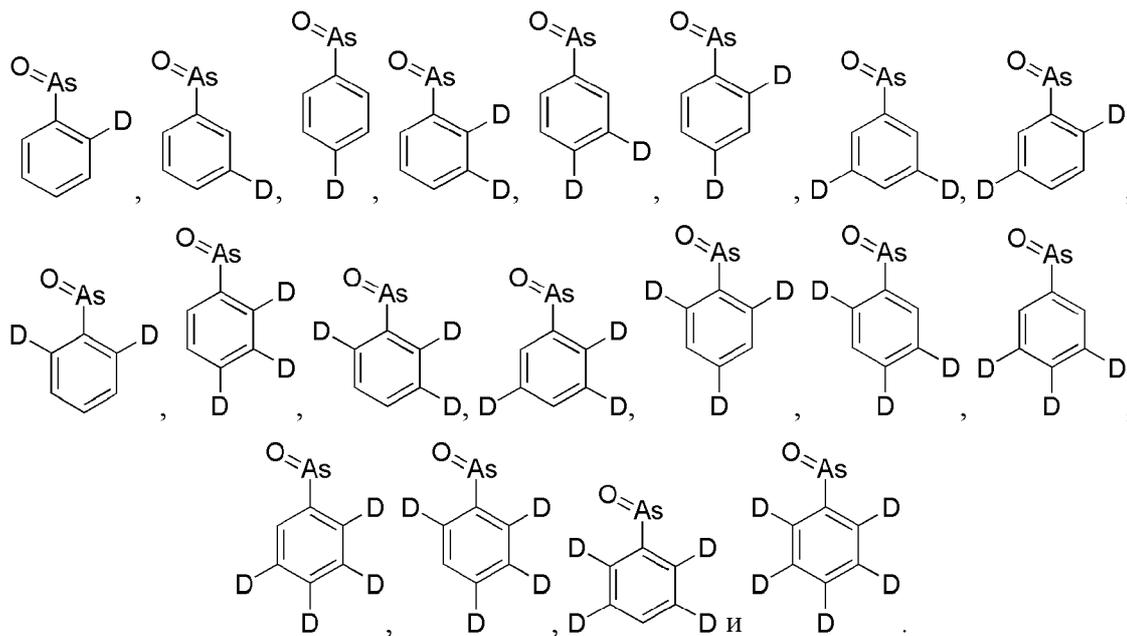
В одном из воплощений, где n равно 1 или 2, каждый R^6 независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, амино, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, $-NH-C(O)R^7$ или $-NH-S(O)_2R^8$, где R^7 представляет собой C1-6-алкил, который возможно замещен 6-12-членным арилом, R^8 представляет собой 6-12-членный арил, который возможно замещен одним галогеном, C1-6-алкоксилем или C1-6-галогеналкилом.

В одном из воплощений R^6 расположен в *орто*-положении и/или *пара*-положении группы $-As(O)$.

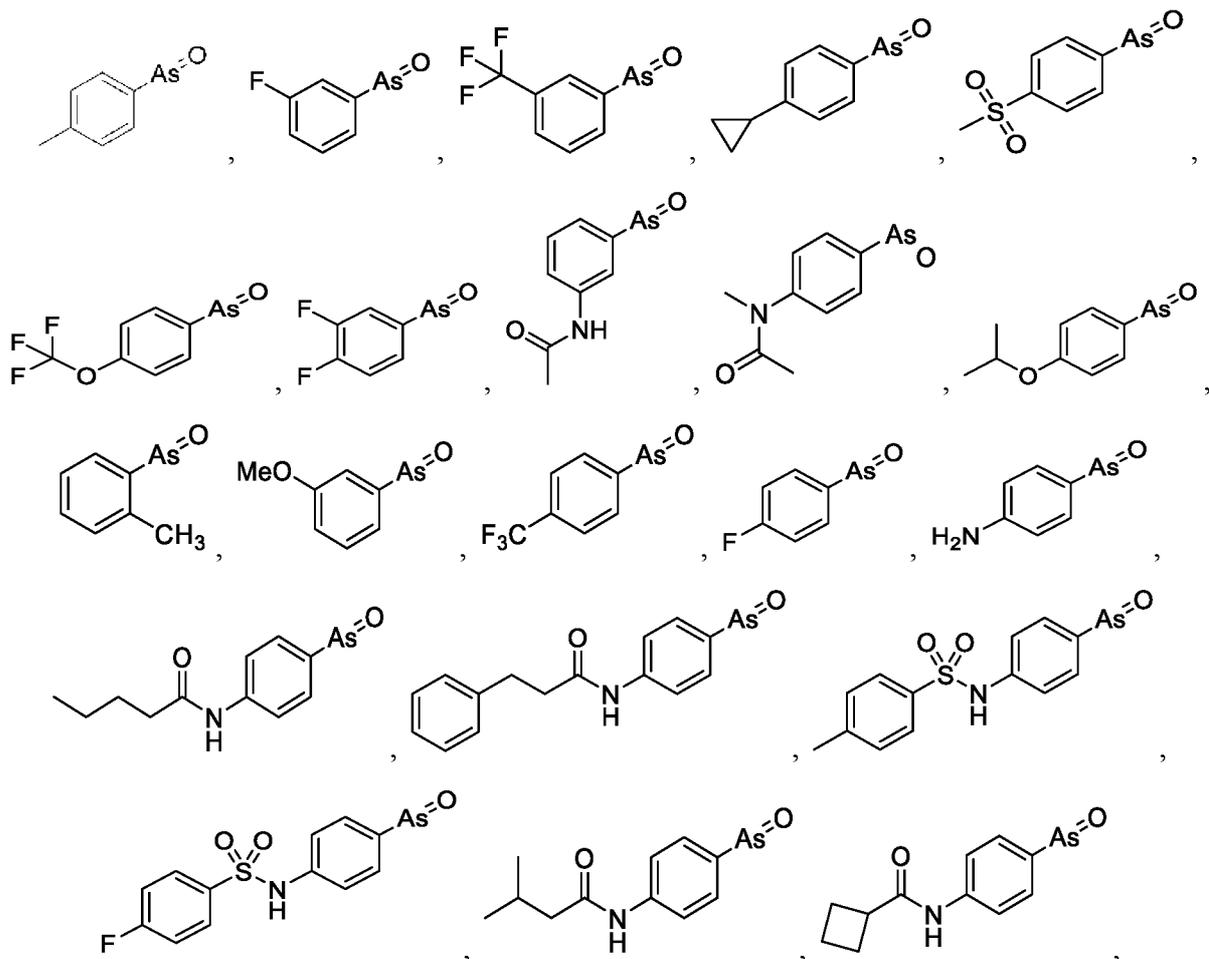
В одном из воплощений n равно 0.

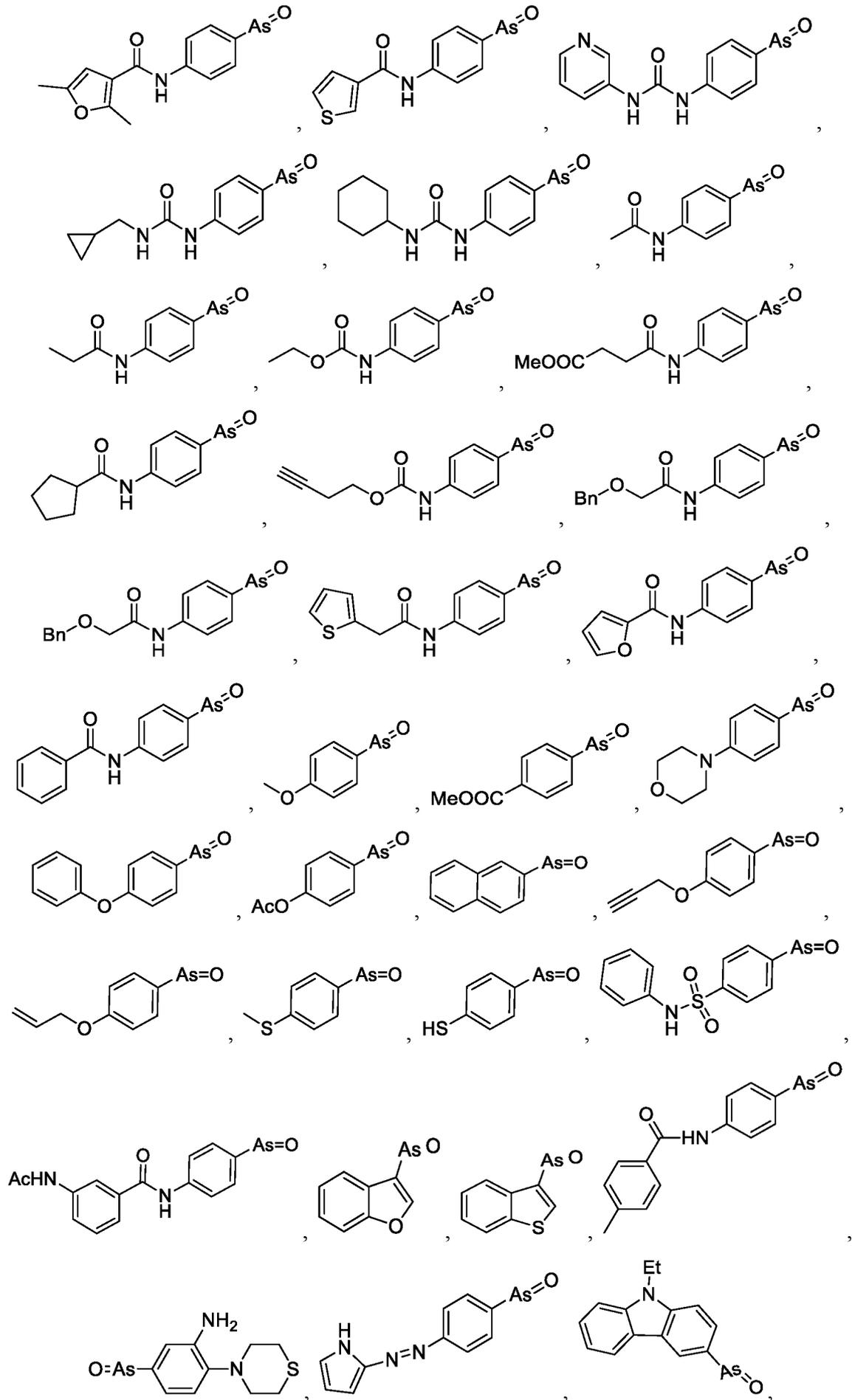
В одном из воплощений, где R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 независимо выбраны из H, дейтерия, галогена, метила, монодейтерометила, дидейтерометила или тридейтерометила, и по меньшей мере один из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляет собой дейтерий или является дейтерированным; предпочтительно, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 независимо выбраны из H или дейтерия, и по меньшей мере один из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляет собой дейтерий, по меньшей мере два из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляют собой дейтерий, предпочтительно по меньшей мере три, четыре или пять из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляют собой дейтерий, более предпочтительно, соединение выбрано из группы, состоящей из следующих

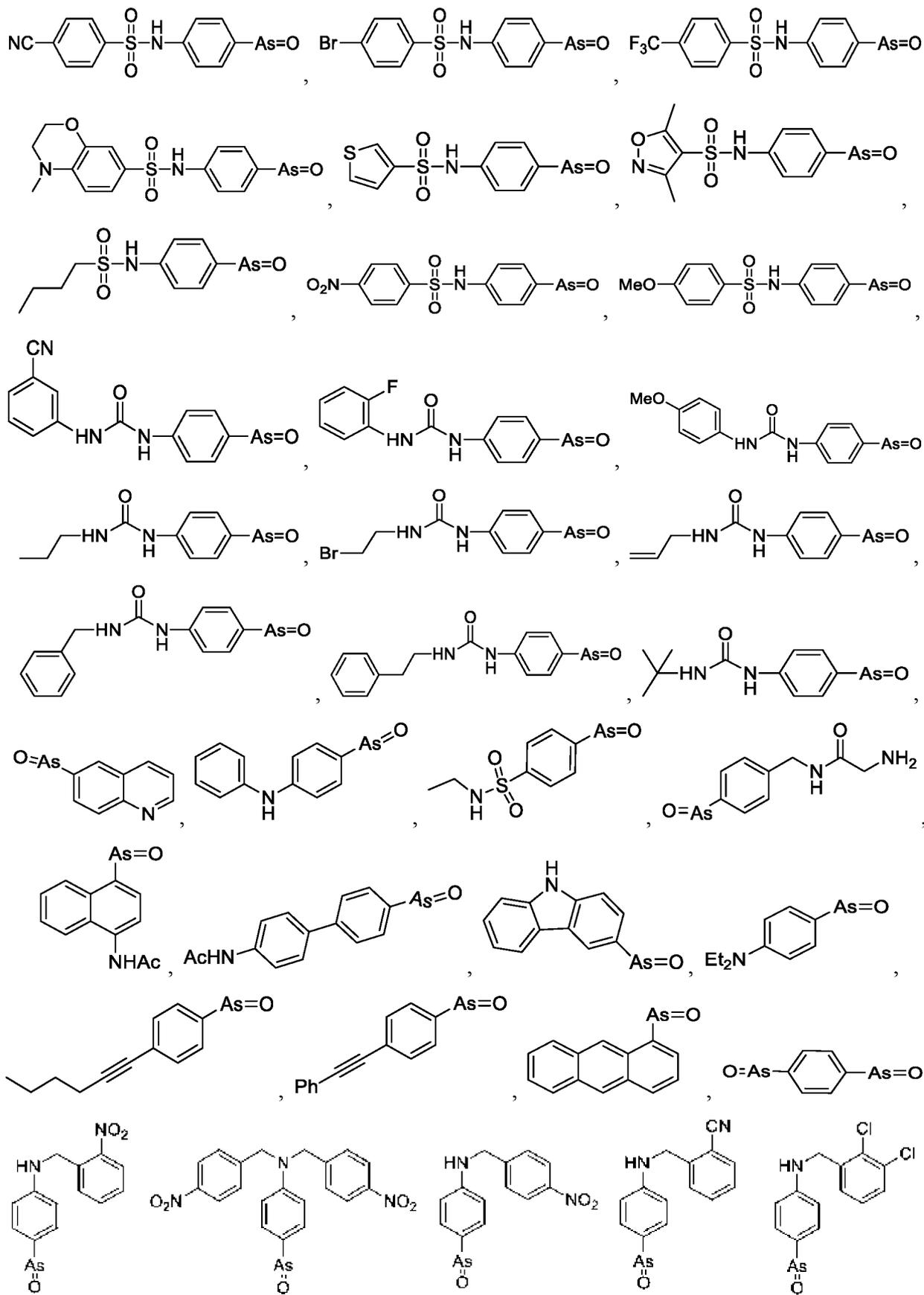
соединений:

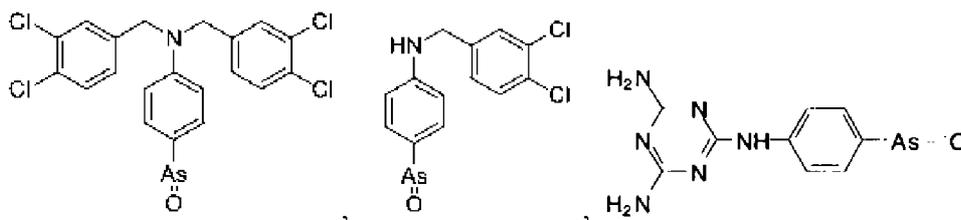


В одном из воплощений соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:









В одном из воплощений субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком.

В одном из воплощений повреждение клеточной ткани, вызванное воздействием радиации, выбрано из повреждения клеток или тканей и органов, вызванного рентгеновскими лучами.

В одном из воплощений симптом вызванного воздействием радиации повреждения клеточной ткани выбран из по меньшей мере одного из пониженного слюноотделения, сухого рта, мукозита, вызванного повреждением слюнных желез, вызванным рентгеновскими лучами, фиброза ткани и органа и лейкопении, вызванной рентгеновским излучением.

В одном из воплощений опухоль выбрана из лимфомы (например, острой не-B- или не-T-клеточной лимфомы), рака шейки матки, рака эндометрия, рака печени, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого или мелкоклеточного рака легкого), колоректального рака, рака желудка, рака кожи (например, меланомы), рака кости, остеосаркомы, миеломы, рака крови (например, острого или хронического лейкоза), рака яичника, опухоли предстательной железы, опухоли головного мозга (например, церебральной астроцитомы), нейробластомы, рака щитовидной железы, злокачественной эмбриональной рабдомиосаркомы.

В одном из воплощений, дополнительно включающем введение второго реагента нуждающемуся в этом субъекту, второй реагент предпочтительно представляет собой реагент, применяемый для лечения опухоли.

В одном из воплощений второй реагент представляет собой реагент, применяемый для лечения опухоли.

В одном из воплощений лекарственное средство для лечения опухолей предпочтительно представляет собой противоопухолевое средство, препятствующее митозу, такое как паклитаксел или альбумин-паклитаксел, лекарственное средство, непосредственно влияющее на структуру и функцию ДНК, такое как карбоплатин или цисплатин, или ингибитор KRAS (вирус крысиной саркомы Кирстена).

В одном из воплощений соединение вводят до, после или одновременно с вторым

реагентом.

В настоящем описании изобретения дополнительно раскрыт способ скрининга лекарственных средств для предупреждения или лечения заболевания, включающий приведение лекарственного средства-кандидата в контакт с белком или нуклеиновой кислотой Р14КШ α или Р14КШ β и тестирование на способность лекарственного средства-кандидата ингибировать образование или активность Р14КШ α , и заболевание выбрано из фиброза сердца, повреждения клеточной ткани, вызванного воздействием радиации, атеросклероза или артериального рестеноза, сахарного диабета или астмы.

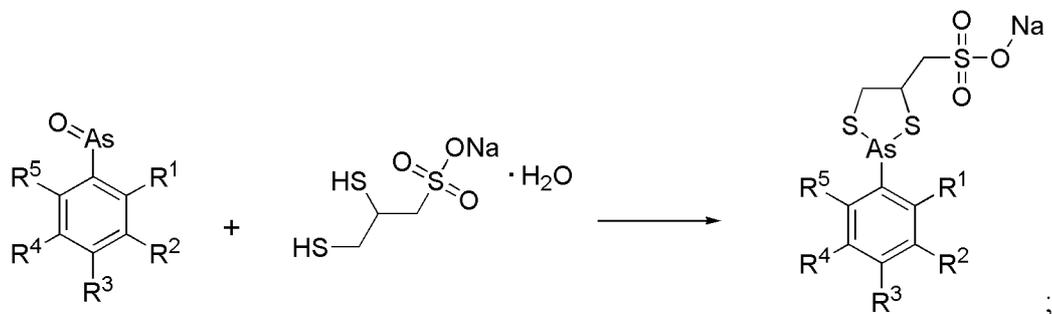
В настоящем описании изобретения дополнительно раскрыт способ измерения концентрации РАО или его производного в крови, где производное включает соединение формулы (I) или формулы (II), включающий следующие стадии:

Стадия 1: приготовление трех исходных растворов путем растворения РАО или его производного, контрольного стандарта и 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия соответственно в отдельных контейнерах;

Стадия 2: смешивание крови, содержащей подлежащий тестированию РАО или его производное, с исходным раствором 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия, доведение раствора до кислотности и инкубирование при 25-80°C в течение соответствующего периода времени;

Стадия 3: добавление исходного раствора контрольного стандарта в раствор, полученный на стадии 2, встряхивание в течение определенного периода времени и центрифугирование, и отбор надосадочной жидкости для тестирования продукта дериватизации РАО или его производного;

где на стадии 2 время инкубирования составляет 10-80 минут, кислотность представляет собой рН менее 6, раствор доводят до кислотности добавлением соответствующего количества кислоты, такой как муравьиная кислота, гидрофосфат калия, уксусная кислота или соляная кислота, и реакция на стадии 2 следующая:



где на стадии 1 РАО или его производное и контрольный стандарт растворяют в DMSO (диметилсульфоксид), раствор контрольного стандарта в DMSO разбавляют ацетонитрилом, и 2,3-димеркаптопропансульфонат натрия растворяют в чистой воде;

где контрольный стандарт представляет собой толбутамид, и на стадии 3 продукт дериватизации PAO или его производного измеряют методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии.

Производное PAO выбрано из дейтерированного или галогенированного соединения, такого как соединение формулы (I) или формулы (II), или любого из вышеупомянутых производных PAO.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 демонстрирует фармакокинетическую кривую концентрация лекарственного средства-время у самцов крыс SD после однократного внутривенного введения 0,1 мг/кг PAO, d5PAO (или d5-PAO) и F2m-PAO (или F2mPAO).

Фиг. 2 демонстрирует фармакокинетическую кривую концентрация лекарственного средства-время у самцов крыс SD после однократного введения через пероральный зонд 0,2 мг/кг PAO, d5PAO и F2m-PAO.

Фиг. 3 демонстрирует жизнеспособность клеток MRC-5, обработанных серией фторированных соединений в течение 4 ч и 24 ч. Клетки MRC-5 культивировали в течение 4 ч или 24 ч в среде MEM (минимальная питательная среда) (без FBS (фетальная бычья сыворотка)), содержащей 5 нг/мл TGF- β 1 и серию фторированных соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам. Жизнеспособность клеток анализировали с использованием МТТ (метилтиазолилтетразолия бромид). (A) Разные концентрации каждого фторированного соединения использовали для обработки в течение 4 ч для определения жизнеспособности клеток; (B) разные концентрации каждого фторированного соединения использовали для обработки в течение 24 ч для определения жизнеспособности клеток. Сравнивали с группой обработки 5 нг/мл TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста бета-1). * указывает на то, что $p < 0,03$.

Фиг. 4 демонстрирует ингибирование экспрессии коллагена типа I, α -SMA (α -гладкомышечный актин) и кальпонины 1 серией фторированных соединений в модельных клетках MRC-5. (A) Уровни экспрессии α -SMA, кальпонины 1 и коллагена типа I, определенные методом иммуноблоттинга белков. (B) Результаты статистического анализа экспрессии коллагена типа I в каждой группе. (C) Результаты статистического анализа экспрессии α -SMA в каждой группе. (D) Результаты статистического анализа экспрессии кальпонины 1 в каждой группе. Интенсивность сигнала белка анализировали с использованием программного обеспечения Image J, интенсивность сигнала контрольной (ctrl) группы была принята равной 1, $n=3$, и обработку осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего) и сравнивали с группой обработки 5

нг/мл TGF- β 1, * $p < 0,03$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, и сравнивали с контрольной группой, # $p < 0,03$.

Фиг. 5 демонстрирует ингибирование экспрессии α -SMA серией фторированных соединений в модельных клетках MRC-5. (А) Графики иммунофлуоресценции α -SMA в каждой группе: зеленый: α -SMA, синий: DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) (ядерный). Масштабная линейка: 50 мкм. (В) Анализ статистических результатов по интенсивности иммунофлуоресценции α -SMA. Среднее значение в контрольной группе было принято равным 1, $n=5$, и результаты обрабатывали методом однофакторного ANOVA; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM и сравнивали с группой обработки 5 нг/мл TGF- β 1, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Фиг. 6 демонстрирует ингибирование экспрессии кальпонины 1 серией фторированных соединений в модельных клетках MRC-5. (А) Графики иммунофлуоресценции кальпонины 1 в каждой группе: красный: кальпонин 1, синий: DAPI (ядерный). Масштабная линейка: 50 мкм. (В) Анализ статистических результатов по интенсивности иммунофлуоресценции кальпонины 1. Среднее значение контрольной группы было принято равным 1, $n=5$, и результаты обрабатывали методом однофакторного ANOVA; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM и сравнивали с группой обработки 5 нг/мл TGF- β 1, * $p < 0,03$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Фиг. 7 демонстрирует, что лентивирусные векторы кшРНК-интерференции снижают экспрессию PI4KIII α . Лентивирусные векторы кшРНК-интерференции инкубировали совместно с клетками MRC-5 в течение 48 часов, и белки собирали для экспериментов методом иммуноблоттинга белков. (А) Определение белка PI4KIII α ; (В) данные анализировали с использованием программного обеспечения Image J, нормализовали с группой sh-ctrl как 1, $n=3$; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой sh-ctrl, *** $p < 0,0001$.

Фиг. 8 демонстрирует ингибирование экспрессии кальпонины 1 и α -SMA нокдауном PI4KA в клетках MRC-5, обработанных TGF- β 1. Клетки MRC-5 культивировали в течение 24 часов, добавляя лентивирусные векторы с разными последовательностями после клеточной адгезии, и затем обрабатывали 5 нг/мл TGF- β 1 или без него в течение 24 часов в соответствии с распределением по группам и наблюдали путем иммунофлуоресцентного окрашивания. (А) Иммунофлуоресцентное окрашивание α -SMA в каждой группе: красный: α -SMA, синий: DAPI (ядерный), зеленый: зеленый флуоресцентный белок GFP. Масштабная линейка: 50 мкм. (В) Иммунофлуоресцентное окрашивание кальпонины 1 в каждой группе: красный: кальпонин 1, синий: DAPI (ядерный), зеленый: зеленый флуоресцентный белок (GFP). Масштабная линейка: 50 мкм.

(С) Анализ статистических результатов интенсивности иммунофлуоресценции α -SMA и кальпонины 1, нормализованных со средним значением для группы sh-ctrl как 1, n=5; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, обработанной совместно sh-ctrl и 5 нг/мл TGF- β 1, *p<0,03, ***p<0,0001, сравнивали с группой sh-ctrl, ##p<0,001, ###p<0,0001.

Фиг. 9 демонстрирует воздействие d5PAO и PAO в разных концентрациях на культивированные фибробласты сердца. n=3, данные обрабатывали методом однофакторного ANOVA; между группами использовали анализ с использованием критерия Стьюдента, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, подвергнутой 24-часовой аноксии в течение 24 часов, воздействия 100 нмоль/л d5PAO и PAO на пролиферацию и миграцию фибробластов сердца (***p<0,0001).

На Фиг. 10 представлен график анализа результатов кПЦР (количественная полимеразная реакция) ингибирования экспрессии генов α -SMA и Col 1A оксидом фениларсина (PAO) в клетках с гипоксией, индуцированной стимулом. n=3, данные обрабатывали с использованием однофакторного ANOVA; между группами использовали анализ с использованием критерия Стьюдента, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, подвергнутой 24-часовой аноксии, 50 нмоль/л и 100 нмоль/л PAO могут играть роль в ингибировании фиброза сердечных фибробластов (*p<0,05, **p<0,001).

На Фиг. 11 представлены результаты WB (вестерн-блоттинга), которые показывают, что 24-часовая аноксия значительно увеличивает экспрессию белка коллагена типа I в кардиомиоцитах. (А, В) Значения интенсивности сигналов α -SMA и коллагена типа I; (С) графики результатов WB при разных концентрациях PAO. n=3, данные обрабатывали с использованием однофакторного ANOVA, для анализа между группами использовали критерий Стьюдента, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, подвергнутой 24-часовой аноксии, 20 нмоль/л, 50 нмоль/л и 100 нмоль/л PAO могут играть роль в ингибировании фиброза в сердечных фибробластах (*p<0,05, **p<0,001).

Фиг. 12 демонстрирует ингибирование экспрессии белков коллагена-I и α -SMA под действием A1 и G1 в клетках с гипоксией, индуцированной стимулом. (А, В) Значения интенсивности сигнала α -SMA и коллагена типа I; (С) графики результатов вестерн-блоттинга (WB) A1 и G1 при 100 нмоль/л. n=3, данные обрабатывали методом однофакторного ANOVA и анализировали с использованием критерия Стьюдента между группами; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, подвергнутой 24-часовой аноксии. 100 нмоль/л A1 и G1 могут играть роль в

ингибировании фиброза в сердечных фибробластах (** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

Фиг. 13 демонстрирует ингибирование миграции индуцированных аноксией фибробластов сердца PAO и d5PAO. (A, C): результаты 100 нмоль/л d5PAO/PAO в клеточном скретч-анализе (анализ миграции клеток в зону царапины); (B, D) статистический анализ: $n=3$, для анализа между группами использовали критерий Стьюдента; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; сравнивали с группой, подвергнутой 24-часовой аноксии, 100 нмоль/л d5PAO и PAO могут играть роль в ингибировании фиброза в сердечных фибробластах (* $p < 0,05$).

Фиг. 14 демонстрирует, что PAO эффективно ингибирует увеличение экспрессии белка α -SMA и коллагена-1 в зоне инфаркта. (A, B) Значения интенсивности сигналов белка α -SMA и коллагена типа I; (C) график результатов WB 0,3 мг/кг PAO. $n=3$, для анализа между группами использовали критерий Стьюдента; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; в сравнении с группой моделирования инфаркта 0,3 мг/кг PAO может играть роль в ингибировании фиброза в фибробластах сердца (* $p < 0,05$).

Фиг. 15 демонстрирует, что PAO эффективно ингибирует увеличение площади фиброза зоны инфаркта, содержащей область коллагена. (A, B) Статистические графики результатов окрашивания HE и по Массону; (C) графики результатов окрашивания HE и по Массону. $n=5$, для анализа между группами использовали критерий Стьюдента; данные выражали в виде среднего значения \pm SEM; в сравнении с группой моделирования инфаркта 0,3 мг/кг PAO может играть роль в ингибировании фиброза фибробластов сердца (** $p < 0,001$).

Фиг. 16 демонстрирует информацию о плазмиде сверхэкспрессии α -синуклеина.

Фиг. 17 демонстрирует получение стандартной кривой для образцов.

Фиг. 18 демонстрирует, что серия фторированных соединений оказывает воздействие на жизнеспособность клеток и промотирует эффлюкс α -синуклеина. Клетки SH-sy5y трансфицировали холостой (носитель) плазмидой или плазмидой сверхэкспрессии α -синуклеина с использованием реагента для трансфекции Fugene HD, после 24 ч трансфекции подвергали голоданию в течение 24 ч, соответственно обрабатывали F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в разных концентрациях согласно распределению по группам. (A) Жизнеспособность клеток измеряли методом МТТ после обработки разными концентрациями серии фторсодержащих соединений в течение 4 ч; (B) Жизнеспособность клеток измеряли методом МТТ после обработки разными концентрациями серии фторсодержащих соединений в течение 24 часов; (C) Содержание α -синуклеина в надосадочной жидкости культуральной среды определяли с использованием наборов для ELISA и вычисляли концентрацию α -синуклеина для каждой

группы по стандартной кривой; (D) данные нормализовали со средним значением концентрации α -синуклеина в группе холостой плазмиды (носитель) как 1, $n=3$, среднее значение \pm SEM, однофакторный ANOVA, сравнивали с группой сверхэкспрессии α -синуклеина (α -syn OE), $*p<0,03$, $**p<0,001$.

Фиг. 19 демонстрирует, что серия фторированных соединений не сказывалась на жизнеспособности стабильно трансфицированных APP (SW) клеток HEK293 и способствовали высвобождению А β . (A) жизнеспособность клеток стабильно трансфицированных APP(SW) клеток HEK293, обработанных определенной концентрацией серии фторированных соединений в течение 4 ч, определяли методом МТТ-анализа; (B) жизнеспособность клеток стабильно трансфицированных APP(SW) клеток HEK293, обработанных определенной концентрацией серии фторированных соединений в течение 24 ч, определяли методом МТТ, $n=5$, среднее значение \pm SEM, однофакторный ANOVA; (C) содержание А β 42 в надосадочной жидкости культуральной среды определяли с использованием набора для ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), и значения А β 42 для каждой группы вычисляли по стандартной кривой; (D) данные нормализовали со средним значением концентрации А β 42 в контрольной группе (ctrl) как 1, и вычисляли значение кратности изменения содержания А β 42 в каждой группе, $n=3$, среднее значение \pm SEM, однофакторный ANOVA, сравнивали с контрольной группой, $*p<0,03$.

На Фиг. 20 представлена пустая векторная карта H14734.

На Фиг. 21 представлена полная карта H14734.

На Фиг. 22 представлена пустая векторная карта H303 pcDNA3.1.

На Фиг. 23 представлена полная карта H303 pcDNA3.1.

Фиг. 24 демонстрирует, что серия фторированных соединений промотируют секрецию НТТ. (A) Клеточные линии, сверхэкспрессирующие НТТ, подвергали голоданию в течение 24 часов, затем инкубировали с серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 24 часов, добавляли МТТ и инкубировали в течение 4 часов, и определяли значения поглощения. $n=5$, данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, однофакторный ANOVA, сравнивали с контрольной группой, $***p<0,0001$. (B) Клеточные линии, сверхэкспрессирующие НТТ в течение 24 часов, подвергали голоданию в течение 24 часов, затем инкубировали с серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 4 часов, собирали надосадочную жидкость клеточной культуры и определяли концентрацию белка НТТ методом ELISA. $n=3$, данные выражали в виде среднего \pm SEM, однофакторный ANOVA, сравнивали с контрольной группой, $*p<0,03$, $***p<0,01$.

Фиг. 25 демонстрирует, что серия фторированных соединений промотируют секрецию SOD1. (А) Клеточные линии, сверхэкспрессирующие SOD1 в течение 24 часов, подвергали голоданию в течение 24 часов, затем инкубировали с серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 24 часов, добавляли МТТ, инкубировали в течение 4 часов и определяли значения поглощения. $n=5$, данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, однофакторный ANOVA, сравнивали с контрольной группой, $***p<0,0001$. (В) Клеточные линии, сверхэкспрессирующие SOD1 в течение 24 часов, подвергали голоданию в течение 24 часов, затем инкубировали с серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 4 часов, собирали надосадочную жидкость клеточной культуры и определяли концентрацию белка SOD1 методом ELISA. $n=3$, данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, однофакторный ANOVA.

Фиг. 26 демонстрирует, что серия фторированных соединений оказывают защитное действие в клеточной модели SH-SY5Y, сконструированной с использованием СВЕ (эпоксид кондуритола В). Клетки SH-SY5Y обрабатывали 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч, подвергали голоданию (DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) с высоким содержанием глюкозы без FBS) и совместно обрабатывали 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч, и затем обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с использованием МТТ-анализа, $n=5$, данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, сравнивали с группой, обработанной 100 мкМ СВЕ, $*p<0,03$, $**p<0,001$, $***p<0,0001$.

Фиг. 27 демонстрирует ингибирование лизосомного накопления, индуцированного СВЕ, серией фторированных соединений. (А) Клетки SH-SY5Y совместно инкубировали с лизосомным трекером Lyso-Tracker в течение 30 мин, затем надосадочную жидкость аспирировали и заменяли РАО в разных концентрациях и инкубировали в течение 10 мин, и Lyso-Tracker определяли по иммунофлуоресценции; (В) статистический анализ интенсивности флуоресценции Lyso-Tracker в каждой группе; $n=5$; однофакторный анализ ANOVA, сравнивали с группой, обработанной 100 мкМ СВЕ, $*p<0,03$, $**p<0,001$, $***p<0,0001$.

Фиг. 28 демонстрирует светлое поле клеток, обработанных серией фторированных соединений в течение 12 ч. Клетки BV2 культивировали в течение 48 ч. Среду удаляли и заменяли средой DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 1 мкг/мл LPS (липополисахарид). Клетки обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам в общей сложности в течение 12 ч и фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus IX50 (Olympus, Япония). Масштабная линейка: 200 мкм.

Фиг. 29 демонстрирует, что серия фторированных соединений ингибируют TNF- α и промотируют экспрессию CD206 в клеточной модели BV2. Клетки BV2 культивировали в течение 48 ч. Среду удаляли и заменяли средой DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 1 мкг/мл LPS. Клетки обрабатывали серией фторсодержащих соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам в общей сложности в течение 12 ч. (А) Участки иммунофлуоресцентного окрашивания групп разной обработки; синий: DAPI, красный: TNF- α , зеленый: CD206. Масштабная линейка: 50 мкм. (В) Статистический анализ интенсивности иммунофлуоресценции TNF- α . (С) Статистический анализ интенсивности иммунофлуоресценции CD206. Среднее значение контрольной группы (ctrl) было принято за 1, n=5, обрабатывали с использованием однофакторного ANOVA, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, сравнивали с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, *p<0,03.

Фиг. 30 демонстрирует отношение интенсивности флуоресценции CD206 к интенсивности флуоресценции TNF- α . Интенсивность иммунофлуоресценции CD206 сравнивали с соответствующей интенсивностью иммунофлуоресценции TNF- α , нормализовали со средним значением отношения контрольной группы, равным 1, n=5, и обрабатывали с использованием однофакторным ANOVA, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM и сравнивали с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, *p<0,03.

Фиг. 31 демонстрирует ингибирование эффлюкса TNF- α серией фторированных соединений. Клетки BV2 культивировали в течение 48 ч. Среду удаляли и заменяли средой DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 1 мкг/мл LPS. Клетки обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам в общей сложности в течение 4 ч, и надосадочную жидкость собирали для ELISA-анализа. (А) Концентрация TNF- α в надосадочной жидкости клеточной культуральной среды, и содержание TNF- α (пг/мл) вычисляли по стандартной кривой; (Б) относительное изменение концентрации TNF- α в каждой группе вычисляли путем принятия среднего значения концентраций в контрольной группе равным 1. n=3, обрабатывали с использованием однофакторного ANOVA, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM и сравнивали с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, *p<0,03, **p<0,001, ***p<0,0001.

Фиг. 32 демонстрирует светлопольную диаграмму окрашивания красителем масляный красный О.

Фиг. 33 демонстрирует, что сигнал окрашивания красителем масляный красный О клеток THP-1, дифференцированных обработкой ox-LDL (окисленный липопротеин низкой плотности) (модель), сильнее, чем у клеток, не обработанных ox-LDL (контроль).

Фиг. 34 демонстрирует воздействие F3PAO и d5PAO на массу тела мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира. Критерий Стьюдента, *p<0,05 и **p<0,001 (сравнивали с группой МСТ (среднепочечный триглицерид)).

Фиг. 35 демонстрирует воздействие PAO на массу тела мышей, получавших корм с высоким содержанием жира. Критерий Стьюдента, *p<0,05 (сравнивали с группой МСТ).

Фиг. 36 демонстрирует воздействие PAO, F3PAO и d5PAO на уровень глюкозы в крови натощак у мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира. Критерий Стьюдента, **p<0,01 и ***p<0,001 (сравнивали с группой МСТ).

На Фиг. 37 представлена реакция дериватизации PAO с использованием димеркаптосульфата натрия.

На Фиг. 38 представлена хроматограмма ЖХ-МС/МС репрезентативной цельной крови крысы SD, в которую PAO (1000 нг/мл) добавляли и дериватизировали.

На Фиг. 39 представлена хроматограмма ЖХ-МС/МС репрезентативной цельной крови крысы SD, в которую PAA (1000 нг/мл) добавляли и дериватизировали.

Фиг. 40 демонстрирует свойства распределения в тканях PAO у крыс SD после однократного введения через пероральный зонд.

Фиг. 41 демонстрирует окрашивание мышинной атеросклеротической бляшки красителем масляный красный O, показывающее, что PAO уменьшает атеросклеротическую бляшку.

Фиг. 42 демонстрирует, что PAO уменьшает площадь атеросклеротических бляшек у мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира. n=4-6, *: P<0,05.

Фиг. 43 демонстрирует воздействие PAO на изменение массы тела в мышинной модели астмы.

Фиг. 44 демонстрирует, что PAO способен улучшать дыхательную функцию в мышинной модели астмы: мониторинг ответной реакции дыхательных путей - статистический анализ индекса Penh.

Фиг. 45 демонстрирует, что PAO способен ингибировать повышение общего количества лейкоцитов в мышинной модели астмы.

Фиг. 46 демонстрирует, что PAO способен ингибировать рост разных типов лейкоцитов в мышинной модели астмы.

Фиг. 47 демонстрирует PAO положительно сказывается на респираторных патологических изменениях, являющихся следствием моделирования астмы.

Фиг. 48 демонстрирует, что PAO, d5PAO и F3PAO снижают накопление липидных капель и триглицеридов в гепатоцитах, вызванное олеиновой кислотой.

Фиг. 49 демонстрирует, что F3PAO ингибирует Ang2-индуцированную

пролиферацию гладкомышечных клеток A7R5.

Фиг. 50 демонстрирует, что F3PAO ингибирует Ang2-индуцированную экспрессию PCNA, MMP9 гена в клетках A7R5.

Фиг. 51 демонстрирует, что F3PAO ингибирует Ang2-индуцированную экспрессию белков PCNA и MMP9 в клетках A7R5 (WB).

Фиг. 52 демонстрирует, что PAO/F3PAO/GSK-A1 (A1) ингибирует индуцированную Ang2-стимуляцией клеточную экспрессию белка коллагена-1 (WB).

Фиг. 53 демонстрирует, что F3PAO ингибирует увеличение Ang2-индуцированной миграционной способности васкулярных гладкомышечных клеток (скретч-анализ).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение подробно описано ниже в соответствии с примерами и в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Вышеизложенные аспекты настоящего изобретения и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидны из нижеследующего подробного описания. Объем настоящего изобретения не ограничен нижеследующими примерами.

Термин “соединение”, используемый в данном документе, охватывает все стереоизомеры (например, энантиомеры и диастереомеры), геометрические изомеры, таутомеры и изотопы показанной структуры.

Описанные в данном документе соединения могут быть асимметрическими (например, могут иметь один или более стереоцентров). Если не указано иное, все стереоизомеры, например энантиомеры и диастереомеры, охвачены. Различные геометрические изомеры, такие как алкены, углерод-углеродные двойные связи, также могут присутствовать в соединениях, описанных в настоящем документе, и все такие стабильные изомеры учтены в настоящем документе. *Цис*- и *транс*-геометрические изомеры соединений описаны в настоящем документе и могут быть выделены в виде смесей изомеров или в виде индивидуальных изомеров.

Описанные в данном документе соединения также включают таутомерные формы. Таутомерные формы обусловлены взаимопревращением одинарной связи и соседней двойной связи, сопровождающимся миграцией протонов. Таутомерные формы включают протонные таутомеры в изомерном протонированном состоянии с одинаковой химической формулой и одинаковым суммарным зарядом. Примерами протонных таутомеров являются кето-енольная пара, пара амид-имидиновая кислота, пара лактам-лактим, пара енамин-имин и кольцевая форма, в которой протоны могут занимать два или более положений гетероциклической системы, например 1Н- и 3Н-имидазол, 1Н-, 2Н- и 4Н-1,2,4-триазол, 1Н- и 2Н-изоиндол, 1Н- и 2Н-пирозол. Таутомерные формы могут быть

равновесными или стерически затрудненными в виде одной формы при соответствующем замещении.

В некоторых воплощениях низкомолекулярные соединения могут быть получены путем органического синтеза. Приведенные в настоящем документе соединения, включая их соли, сложные эфиры, гидраты или сольваты, могут быть получены по любой общеизвестной технологии органического синтеза и могут быть синтезированы многими возможными путями синтеза.

PI4KIII α -специфические ингибиторы

Используемый в данном документе термин “PI4KIII α -специфический ингибитор” относится к классу веществ, способных специфически снижать, уменьшать или устранять транскрипцию или трансляцию гена PI4KIII α и/или активность белка PI4KIII α . В некоторых воплощениях PI4KIII α -специфический ингибитор способен снижать активность PI4KIII α по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 80%, 90%, 95% и более. В данном документе, когда «активность» используется в сочетании с увеличением или уменьшением, тогда она относится к обнаруженной функциональной активности, которая может характеризоваться изменением содержания или отсутствием изменения содержания, но изменением функциональной активности.

В данном документе активность PI4KIII α относится к активности белка PI4KIII α фосфорилировать фосфатидилинозитол (PI) в конкретном сайте (например, превращать в фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P)). PI4KIII α -специфический ингибитор имеет константу связывания с белком PI4KIII α , которая по меньшей мере в два раза больше, чем его константа связывания с другими не специфически связывающимися белками. В некоторых воплощениях PI4KIII α -специфический ингибитор способен распознавать предпочтительно белки PI4KIII α в сложных смесях, в том числе в смесях с другими белками подтипа PI4K.

В некоторых воплощениях по сравнению с другими подтипами белков PI4K (например, белками PI4K, включая PI4KII α или PI4KII β) PI4KIII α -специфический ингибитор ингибирует PI4KIII по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз, 500 раз или 10000 раз сильнее. Например, в некоторых воплощениях PI4KIII α -специфический ингибитор по существу не ингибирует PI4KII (например, PI4KII α или PI4KII β), например с IC₅₀ больше или равной 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 60 мкМ, 80 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ.

В некоторых воплощениях по сравнению с другими подтипами PI4KIII (например, PI4KIII β), PI4KIII α -специфический ингибитор ингибирует PI4KIII α по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз, 200 раз, 500 раз или 10000

раз сильнее.

В некоторых воплощениях IC_{50} РІ4КІІІ α -специфического ингибитора против РІ4КІІІ α составляет менее или равно 100 мкМ, 80 мкМ, 50 мкМ, 30 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ, 3 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,2 мкМ, 0,1 мкМ, 0,05 мкМ, 0,02 мкМ, 0,01 мкМ, 0,005 мкМ, 0,002 мкМ или 0,001 мкМ. В некоторых воплощениях РІ4КІІІ α -специфический ингибитор представляет собой антитело, низкомолекулярное соединение, молекулу РНК-интерференции или антисмысловую нуклеиновую кислоту.

В некоторых воплощениях РІ4КІІІ α -специфический ингибитор представляет собой антитело.

Термин “антитело”, используемый в данном документе, охватывает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, поливалентное антитело, бивалентное антитело, моновалентное антитело или антитело, которое может связываться со специфическим антигеном. Термин “антитело” в данном документе широко охватывает традиционные антитела с четырьмя цепями и нетрадиционные антитела без четырех цепей (например, антитела, у которых естественным образом отсутствуют легкие цепи).

Традиционное интактное антитело представляет собой гетеротетрамер, который содержит две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Тяжелые цепи млекопитающих подразделяются на α , δ , ϵ , γ и μ . Каждая тяжелая цепь состоит из одного переменного домена (V_H) и первого, второго и третьего константных доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} соответственно). Легкие цепи млекопитающих подразделяются на λ или κ . Каждая легкая цепь состоит из одного переменного домена (V_L) и одного константного домена. Традиционные антитела имеют «Y»-образную структуру с шейкой, состоящей из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждое плечо «Y»-образной структуры содержит переменный домен и первый константный домен одной из двух тяжелых цепей, которые соединены с переменным доменом и константным доменом одной легкой цепи. Переменные домены легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание с антигеном. Переменный домен каждой цепи содержит три гиперпеременные области, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR) (CDR легкой цепи включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и CDR тяжелой цепи включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3). Три CDR разделены боковым смежным участком каркасной области (FR), и FR является в более высокой степени консервативной, чем CDR, и образует каркас для поддержки гиперпеременной петли. Константная область тяжелой цепи и легкой цепи не участвует в связывании с антигеном, но выполняет множественные эффекторные функции.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, образованному фрагментом антитела, содержащим одну или более CDR, но не имеющим целостной структуры антитела. Например, антигенсвязывающий фрагмент включает, но без ограничения ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv, верблюжье однодоменное антитело и нанотело. Антигенсвязывающий фрагмент может связываться с тем же антигеном, что и родительское антитело.

Фрагмент "Fab" антитела относится к участку антитела, состоящему из одной легкой цепи (включающей переменный домен и константный домен) и переменного домена и первого константного домена одной тяжелой цепи, которые соединены дисульфидными связями.

Фрагмент "Fab'" относится к фрагменту Fab, содержащему часть шарнирной области.

Фрагмент "F(ab')₂" относится к димеру Fab'.

Фрагмент "Fv" антитела состоит из переменного домена одной легкой цепи и переменного домена одной тяжелой цепи.

«Молекула одноцепочечного антитела» или «scFv» относится к сконструированному антителу, созданному из переменного домена легкой цепи и переменного домена тяжелой цепи, которые соединены напрямую или посредством пептидной цепи. Подробности можно найти в Huston JS et al., Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879 (1988).

«Димер scFv» относится к олигомеру, образованному двумя scFv.

«Верблюжье однодоменное антитело» (которое также называется «антителом с тяжелой цепью» или «антителом только с тяжелой цепью (HCAb)») относится к антителу, содержащему два переменных домена с тяжелой цепью и не содержащему легкую цепь. Антитело с тяжелой цепью первоначально происходит из семейства *Camelidae* (верблюды, одногорбые верблюды и ламы). Несмотря на отсутствие легкой цепи, верблюжье однодоменное антитело обладает всеми функциями для связывания с антигеном.

«Нанотело» состоит из одного переменного домена тяжелой цепи из антитела с тяжелой цепью и двух константных доменов C_{H2} и C_{H3}.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой мышинное антитело,

кроличье антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

Используемый в данном документе термин «полностью человеческое» применительно к антителу или антиген-связывающему фрагменту означает, что аминокислотная последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента соответствует аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или иммунными клетками человека, или получаемых из источников, не являющихся человеком, таких как трансгенные животные, на основе библиотеки антител человека или других последовательностей, кодирующих антитела человека.

Используемый в данном документе термин «гуманизированный» применительно к антителу или антигенсвязывающему фрагменту относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту, включая CDR животных, не являющихся человеком, FR человека, и, где это применимо, константные домены человека. Гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может быть использован(о) в некоторых воплощениях в качестве терапевтического агента для людей, поскольку оно является менее иммуногенным. В некоторых воплощениях животными, не являющимися человеком, являются млекопитающие (такие как мыши, крысы, кролики, козы, овцы, морские свинки или хомяки). В некоторых воплощениях гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по существу полностью состоит из последовательностей человека за исключением того, что последовательности CDR не являются человеческими.

Используемый в данном документе термин «химерный» применительно к антителу или антигенсвязывающему фрагменту относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, включающему тяжелую цепь и/или легкую цепь с одним участком, который происходит от того же вида, а другие участки происходят от других видов. В некоторых воплощениях химерное антитело может включать константный домен человека и переменный домен животного (например, мыши или кролика).

В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем документе, является моноспецифическим, биспецифическим или мультиспецифическим антителом.

В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем документе, может быть также меченым.

В некоторых воплощениях РІ4КІІа-специфический ингибитор представляет собой молекулу РНК-интерференции.

Используемый в данном документе термин «молекула РНК-интерференции» относится к РНК или ее аналогу, который в достаточной степени комплементарен последовательности РНК-мишени для прямой РНК-интерференции. В некоторых

воплощениях также вовлечена ДНК, которая может быть использована для продуцирования РНК. РНК-интерференция представляет собой процесс специфической по отношению в последовательности селекции, при котором молекулы-мишени (например, ген-мишень, белок-мишень или РНК-мишень) подвергаются понижающей регуляции.

В некоторых воплощениях молекула РНК-интерференции способна снижать экспрессию Р14КШ α , например нокаутировать ген Р14КА.

В некоторых воплощениях молекула РНК-интерференции имеет длину 18-100 оснований.

В некоторых воплощениях молекула РНК-интерференции модифицирована для повышения ее стабильности.

В некоторых воплощениях молекула РНК-интерференции представляет собой короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК).

Используемый в данном документе термин «короткая интерферирующая РНК (киРНК)» относится к молекуле РНК, предпочтительно двухнитевой молекуле длиной примерно 10-50 нуклеотидов, предпочтительно длиной примерно 15-25 нуклеотидов, более предпочтительно длиной примерно 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Возможно нить имеет выступающий конец, включающий, например, один, два или три выступающих нуклеотида (или аналогов нуклеотидов), которые могут направлять или опосредовать разрушение РНК.

Используемый в данном документе термин «короткая шпилечная РНК (кшРНК)» относится к молекуле РНК со структурой «стебель-петля», которая включает в себя первую область и вторую область, которые комплементарны друг другу. Степень комплементарности и ориентация областей достаточны для возникновения пар оснований между областями. Первая область и вторая область связаны между собой областью петли. Петля возникает из-за отсутствия образования пар оснований между нуклеотидами (или аналогами нуклеотидов) в области петли.

Используемый в данном документе термин «микроРНК» или «миРНК» означает короткую и встречающуюся в природе одноцепочечную не кодирующую молекулу РНК длиной примерно 16-26 нуклеотидов (nt) (например, примерно 16-29 nt, 19-22 nt, 20-25 nt или 21-23 nt), которая обычно выполняет функцию регуляции экспрессии генов *in vivo*. В эукариотических клетках ген миРНК транскрибируется ДНК-транскриптазой II в «первичный продукт» (перв-миРНК), перв-миРНК быстро перерабатывается рибонуклеазой III (Drosha) в «предшественник» миРНК (пре-миРНК), пре-миРНК транспортируется из ядра в цитоплазму и затем распознается и расщепляется другой

рибонуклеазой III (Dicer) в зрелую миРНК. Зрелая молекула миРНК частично комплементарна одной или более мРНК и регулирует экспрессию белка. Известные последовательности миРНК могут быть получены из общедоступных баз данных, например из базы данных miRBase (www.mirbase.org), предоставляющей информацию о последовательностях миРНК, функциональные аннотации, прогнозируемые гены-мишени и другую информацию. В настоящем изобретении миРНК также включает молекулы РНК со структурой и функцией, сходными с природными миРНК, которые экспрессируются в клетках искусственно синтезированными плазмидами и направленно воздействуют на соответствующие мРНК как естественные молекулы миРНК, предотвращая трансляцию мРНК в белки.

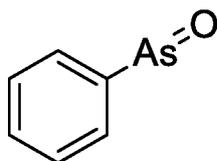
В некоторых воплощениях Р14КШ α -специфический ингибитор представляет собой антисмысловую нуклеиновую кислоту.

Используемый в данном документе термин «антисмысловая нуклеиновая кислота» охватывает нуклеотиды, которые полностью комплементарны последовательности-мишени, и нуклеотиды с одним или более нуклеотидными несоответствиями при условии, что антисмысловая нуклеиновая кислота может специфически гибридизоваться с последовательностью-мишенью. Например, антисмысловая нуклеиновая кислота в настоящей заявке включает полинуклеотиды с по меньшей мере 70%-ной или более, предпочтительно 80%-ной или более, более предпочтительно 90%-ной или более, даже еще более предпочтительно 95%-ной или более гомологией длиной по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов. Транскрипция гена-мишени и/или трансляция мРНК-мишени снижаются или блокируются вследствие образования гибрида.

В некоторых воплощениях ингибитор Р14КШ α представляет собой низкомолекулярное соединение.

Используемый в данном документе термин "низкомолекулярное соединение" означает органическое соединение с молекулярной массой менее 3000, 2500, 2000, 1500, 1000 или 500 дальтон, которое может быть природным или синтезированным химически.

Используемый в данном документе термин «оксид фениларсина» (РАО) относится к низкомолекулярному соединению следующей конкретной химической структуры:



Используемый в данном документе термин «замещенный» применительно к химической группе означает, что один или более атомов водорода химической группы

удалены и заменены заместителем.

Используемый в данном документе термин «заместитель», имеющий его общее значение, известное в данной области техники, относится к химической группировке, которая ковалентно связана или, если это подходит, конденсирована с родительской группой.

Используемый в данном документе термин " C_n-C_m " означает диапазон количества атомов углерода, где n и m представляют собой целые числа, и диапазон количества атомов углерода включает конечные точки (т.е. n и m) и целые числа между ними. Например, C_1-C_6 означает диапазон от 1 до 6 атомов углерода, включая 1, 2, 3, 4, 5 и 6 атомов углерода.

Используемый в данном документе термин "алкил", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к насыщенной гидрокарбильной группе, которая может быть прямоцепочечной или разветвленной. Термин " C_n-C_m -алкил" относится к алкильной группе с от n до m атомов углерода. В некоторых воплощениях группа алкил содержит от 1 до 12, от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 атомов углерода. Например, группа алкил включает, но без ограничения ими, такие химические группы, как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил, *втор*-бутил, 2-метил-1-бутил, *n*-пентил, 3-пентил, *n*-гексил, 1,2,2-триметилпропил и т.д.

Используемый в данном документе термин "алкенил", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к ненасыщенной гидрокарбильной группе, которая может быть прямоцепочечной или разветвленной, с одной двойной углерод-углеродной связью. В некоторых воплощениях алкенильная группа содержит от 2 до 12, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3 атомов углерода. В некоторых воплощениях алкенильная группа может также содержать от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 углерод-углеродных двойных связей. Например, группа алкенил включает, но без ограничения ими, такие химические группы, как винил, *n*-пропенил, изопрпенил, *n*-бутенил, *втор*-бутенил и т.д.

Используемый в данном документе термин "алкинил", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к ненасыщенной алкинильной группе, которая может быть прямоцепочечной или разветвленной, с одной углерод-углеродной тройной связью. В некоторых воплощениях группа алкинил содержит от 2 до 12, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3 атомов углерода. В некоторых воплощениях алкинильная группа может также содержать от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 углерод-углеродных тройных связей.

Например, группа алкинил включает, но не ограничивается ими, такие химические группы, как этинил, пропирил, бутирил и т.д.

Используемый в данном документе термин "циклоалкил" относится к кольцевой алкильной группе, состоящей из по меньшей мере 3 атомов. Термин "n-m-членный циклоалкил" относится к группе циклоалкил с от n до m членов, образующих кольцо. Кроме того, кольцо также может содержать одну или более двойных связей в отсутствие полностью сопряженной системы. В некоторых воплощениях группа циклоалкил содержит от 3 до 8, от 3 до 6 или от 4 до 6 атомов углерода, образующих кольцо. Например, группа циклоалкил включает, но без ограничения ими, циклопропан, циклобутан, циклопентил и др.

Используемый в данном документе термин "гетероциклил" относится к кольцевой группе, в которой по меньшей мере один атом в кольце является гетероатомом, а остальные атомы являются атомами углерода. Термин "n-m-членный гетероциклил" относится к гетероциклильной группе с от n до m членов, образующих кольцо. В настоящей заявке термин "гетероциклил" включает гетероарил и гетероциклоалкил. Кроме того, кольцо также может содержать одну или несколько двойных связей. В некоторых воплощениях гетероциклил представляет собой насыщенную гетероциклоалкильную группу. Например, гетероатом включает, но без ограничения ими, кислород, серу, азот, фосфор и т.д.

Используемый в данном документе термин «гетероциклоалкил» относится к циклоалкильной группе, в которой по меньшей мере один атом в кольце является гетероатомом, а остальные атомы являются атомами углерода. Термин "n-m-членный гетероциклоалкил" относится к гетероциклоалкильной группе с от n до m членов, образующих кольцо. Кроме того, кольцо также может содержать одну или несколько двойных связей в отсутствие полностью сопряженной системы. В некоторых воплощениях гетероциклоалкил представляет собой насыщенную гетероциклоалкильную группу. Например, гетероатом включает, но без ограничения ими, кислород, серу, азот и фосфор. В некоторых воплощениях гетероциклоалкильная группа содержит от 3 до 8, от 3 до 6 или от 4 до 6 атомов углерода, образующих кольцо. Например, группа гетероциклоалкил включает, но без ограничения ими, азетидин, азиридин, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолин, гомопиперазин и др.

Используемый в данном документе термин "арил", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к моно- или поликарбоциклической группе с чередующимися двойными и одинарными связями между атомами углерода, образующими кольцо. Термин "C_n-C_m-арил" относится к арильной

группе с от n до m атомов углерода, образующих кольцо. В некоторых воплощениях арильная кольцевая система содержит от 6 до 12, от 6 до 10 или от 6 до 8 атомов углерода в одном или более кольцах. В некоторых воплощениях арильная кольцевая система содержит два и более конденсированных колец. Например, группа арил включает, но без ограничения ими, такие химические группы, как фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил, инденил и др.

Используемый в данном документе термин "гетероарил" относится к арильной группе, в которой по меньшей мере один кольцевой атом является гетероатомом, а остальные кольцевые атомы являются атомами углерода. Термин "n-m-членный гетероарил" относится к гетероарильной группе с от n до m членов, образующих кольцо. Например, гетероатом включает, но без ограничения ими, кислород, серу, азот, фосфор и т.д. В некоторых воплощениях гетероарильная группа может содержать от 5 до 10, от 5 до 8 или от 5 до 6 членов, образующих кольцо. В некоторых воплощениях гетероарильная группа представляет собой 5- или 6-членный гетероарил. Например, группа гетероарил включает, но без ограничения ими, фурил, тиенил, пиридил, хинолил, пирролил, N-низший алкилпирролил, пиридил-N-оксид, пиримидинил, пиазинил, имидазолил и индолил.

Используемый в данном документе термин "алкокси", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к группе "-O-алкил". Термин "C_n-C_m-алкокси" означает, что алкильная часть алкоксигруппы содержит от n до m атомов углерода. В некоторых воплощениях алкильная часть содержит от 1 до 6, от 1 до 4 или от 1 до 3 атомов углерода. Например, алкоксигруппа включает, но без ограничения ими, такие химические группы, как метокси, этокси, пропокси (например, *n*-пропокси и изопропокси), *трет*-бутокси и т.д.

Используемый в данном документе термин "галогеналкил", независимо от того, используется ли он как часть другого термина или отдельно, относится к группе "-алкил-X", где X представляет собой галоген, выбранный из группы, состоящей из фтора, хлора, брома и йода. Термин "C_n-C_m-галогеналкил" означает, что алкильная часть группы галогеналкил содержит от n до m атомов углерода. В некоторых воплощениях алкильная часть содержит от 1 до 6, от 1 до 4, или от 1 до 3 атомов углерода. Например, группа галогеналкил включает, но без ограничения ими, такие химические группы, как галогенметил, галогенэтил, галогенпропил (например, галоген-*n*-пропил и галогенизопропил), галоген-*трет*-бутил и т.д.

Используемый в данном документе термин "n-членный", где n означает целое число, обычно используется применительно к кольцевой системе для описания количества

атомов в кольцевой системе, которые образуют кольцо. Например, пиперидинил представляет собой одну из 6-членных гетероциклоалкильных групп, пиразолил представляет собой одну из 5-членных гетероарильных групп, пиридил представляет собой одну из 6-членных гетероарильных групп, и 1,2,3,4-тетрагидронафталин представляет собой одну из 10-членных арильных групп. Используемый в данном документе термин "n-m-членный" обычно используется применительно к кольцевой системе для описания количества членов в кольцевой системе, которые образуют кольцо, где n и m представляют собой целые числа, и диапазон образующих кольцо членов включает конечные точки (т.е. n и m) и каждое целое число между ними. Например, 3-8-членный означает диапазон от 3 до 8 образующих кольцо членов, включая 3 члена, 4 члена, 5 членов, 6 членов, 7 членов и 8 членов.

Используемый в данном документе термин "галоген" относится к атому, выбранному из группы, состоящей из атомов фтора, хлора, брома и йода.

Используемый в данном документе термин "циано" относится к группе "-CN".

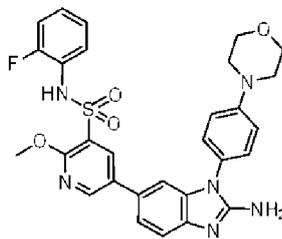
Используемый в данном документе термин "гидроксил" относится к группе "-OH".

Используемый в данном документе термин "нитро" относится к группе "-NO₂".

Используемый в данном документе термин "амино" относится к группе "-NH₂".

Используемый в данном документе термин "карбамоил" относится к группе "-HNCONH₂".

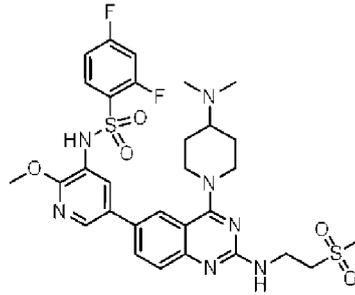
Используемые в данном документе термины "A1" и "G1" оба обозначают низкомолекулярные ингибиторы белка PI4K3α со сходной структурой, где A1 имеет формулу:



A1

5-(2-амино-1-(4-(4-морфолинил)фенил)-1H-бензимидазол-6-ил)-N-(2-фторфенил)-2-метокси-3-пиридинсульфонамид.

G1 имеет формулу:



G1

(aS)-5-(2-амино-4-оксо-3-(2-(трифторметил)фенил)-3,4-дигидрохиназолин-6-ил)-N-(2,4-дифторфенил)-2-метоксипиридин-3-сульфонамид.

Повреждение клеточных тканей, вызванное воздействием радиации

Лучевая терапия является одним из основных способов лечения злокачественных опухолей, и ее основной принцип заключается в использовании высокоэнергетических лучей для разрушения хромосом раковых клеток, тем самым вызывая некроз раковых клеток (особенно тех, которые растут и делятся), и достигая таким образом результата торможения развития опухолей. Облучение включает α , β и γ лучи, излучаемые радиоактивными изотопами, и рентгеновские лучи, электронные лучи, пучки протонов и пучки других частиц, создаваемые различными типами рентгеновских аппаратов или ускорителей и т.д. 70% раковых пациентов нуждаются в лучевой терапии в ходе лечения, и 40% раковых заболеваний могут быть вылечены лучевой терапией. Поэтому лучевая терапия является способом первого выбора и основным способом лечения некоторых типов опухолей, таких как рак полости рта, рак носоглотки, рак пищевода средней стадии, неоперабельный рак легкого, рак кожи и ранняя лимфома. Большинство опухолей нервной системы требуют хирургического вмешательства с последующей лучевой терапией. Опухолями, которые в высокой степени чувствительны к облучению, являются такие опухоли, как злокачественная лимфома, семинома яичка, нефробластома, нейробластома, медуллобластома, мелкоклеточный рак легкого, прогрессирующий рак легких и рак пищевода.

Используемый в данном документе термин «радиоактивные лучи» охватывает α -, β -, γ -лучи, излучаемые радиоизотопами, рентгеновские лучи, создаваемые различными типами рентгеновских аппаратов, или генерируемые ускорителями рентгеновские лучи пучки электронов, пучки протонов или пучки других частиц и т.д.

Используемый в данном документе термин «повреждение клеточных тканей, вызванное воздействием радиации» означает, что радиоактивные лучи приводят к изменениям структуры и функции нормальных клеток, тканей и органов в облучаемой области, таким как повреждение или некроз нормальных клеток, и симптомы

повреждения клеток и тканей, вызванного воздействием радиации, включают повреждение кожи, рвоту, выпадение волос, головную боль, лихорадку, кашель, затруднение глотания, снижение аппетита, изменения в полости рта (сухость), диарею, некроз тканей, снижение показателей периферической крови и т.д., например, снижение секреции слюны из-за повреждения слюнных желез, вызванного рентгеновским излучением головы и шеи, сухость полости рта, мукозит, снижение лейкоцитов вследствие рентгеновского облучения.

Заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка

Используемый в данном документе термин “заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка” относится к заболеваниям, которые характеризуются агрегацией аномально свернутых белков в цитоплазме, а также диагностируются как заболевания, связанные с агрегацией белков (агрегация, накопление) или неправильной укладкой белков. Кроме того, термин «заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка» также охватывает внутриклеточные поражения телец-включений, такие как заболевания, связанные с агрегацией белковых телец-включений, когда тельце-включение в основном состоит из корового белка, который агрегируется вследствие неправильной укладки с различными стрессовыми белками, вовлеченными в реагирование на несвернутый белок.

Заболевания, связанные с неправильной внутриклеточной укладкой белка включают, но без ограничения ими, болезнь Паркинсона (PD), деменцию с тельцами Леви (LBD), множественную системную атрофию (MSA), миозит с тельцами-включениями (IBM), лобно-височную деменцию (FTD), болезнь Гентингтона (HD), полиглутаминовую болезнь (polyQ), боковой амиотрофический склероз (ALS), прионные заболевания.

Лизосомная болезнь накопления

Используемый в данном документе термин "лизосомная болезнь накопления" означает заболевание, вызванное накоплением эндогенных или экзогенных веществ в лизосоме по разным причинам, которые включают, но без ограничения ими, дефекты лизосомной функции, вызванные недостаточной активностью ферментов в лизосоме, или дефицит корректирующих процессинг ферментов белков-активаторов, белков-транспортеров или лизосомного белка, приводящий к неспособности соответствующих субстратов расщепляться во вторичной лизосоме, накоплению субстрата, метаболическим расстройствам и формированию болезни накопления.

Лизосомные болезни накопления включают, но без ограничения ими, расстройства метаболизма сфинголипидов, мукополисахаридоз, болезнь накопления гликогена, болезнь накопления гликопротеинов, болезнь накопления липидов, расстройство дефектных пост-

трансляционных модификаций, расстройство дефицита внутренних мембранных белков, нейрональный восковидный липофусциноз или нарушение функции органелл, связанное с лизосомами. Среди них расстройства метаболизма сфинголипидов включают, но без ограничения ими, болезнь Фабри (Fabre), метаболический дисгерминоз (болезнь Farbe), болезнь Гоше типов I, II, III и перинатальную смерть, ганглиозидоз GM1 типов I, II и III, ганглиозидоз GM2 (семейная амавротическая идиотия), ганглиозидоз GM2 и глободноклеточную лейкодистрофию (болезнь Краббе), метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Ниманна-Пика типов A и B. Мукополисахаридозы включают, но без ограничения ими, синдром Гурлер-Шейе и синдром Шейе (ML I), синдром Хантера (MPS II), синдром Санфилиппо A (MPS IIIA), синдром Санфилиппо B (MPS IIIB), синдром Санфилиппо C (MPS IIIC), синдром Санфилиппо D (MPS IIID), синдром Моркио типа A (MPS IVA), синдром Моркио типа B (MPS IVB), мукополисахаридоз VI типа (синдром Марото-Лами, MPS VI типа), синдром Слая (MPS VII), мукополисахаридоз IX типа (MPS IX). Болезни накопления гликогена, включают, но без ограничения, редкое заболевание болезнь Помпе (GSD II). Расстройства накопления гликопротеинов включают, но без ограничения ими, α -маннозидоз, β -маннозидоз, фукозидоз, аспартилглюкозаминурию, болезнь Шиндлера I типа (младенческая нейраксональная дистрофия), болезнь Шиндлера II типа (болезнь Канзаки), болезнь Шиндлера III типа (средней степени тяжести), сиалический ацидоз I типа (вишнево-красный точечный миоклонус), сиалический ацидоз II типа (мукополисахаридоз I) и галактозный ацидоз слюны. Болезни накопления липидов включают, но без ограничения, дефицит кислой липазы, такой как болезнь Вольмана и болезнь отложения сложных эфиров холестерина. Расстройства дефектной пост-трансляционной модификации включают, но без ограничения ими, множественный дефицит сульфатированной липазы, болезнь накопления муколипидов II α/β (I-клеточная болезнь), болезнь накопления муколипидов II альфа/бета (псевдосиндром Хеллера) и болезнь накопления муколипидов III типа гамма (вариант псевдосиндрома Хеллера). Расстройства, связанные с дефицитом внутреннего мембранного белка, включают, но без ограничения ими, гиперинтенсивность цистина, болезнь Данона, синдром миоклонической почечной недостаточности, расстройства накопления слюнных кислот, такие как ISSD, болезнь Саллы и умеренно тяжелая болезнь Саллы, болезнь Ниманна-Панкейка типов C1 и C2 и болезнь накопления муколипидов IV типа. Нейрональный восковидный липофусциноз, включает, но без ограничения ими, восковидный липофусциноз типа 1 (болезнь Халтия-Сантавуори и INCL), нейрональный восковидный липофусциноз типа 2 (болезнь Янского-Бильшовского), восковидный липофусциноз типа 3 (болезнь Баттена-Шпильмейера-

Шегрена), восковидный липофусциноз типа 4 (болезнь Парри и типы Куфса А и В), восковидный липофусциноз 5 типа (позднемладенческий детский финский гетерозиготный), восковидный липофусциноз типа 6 (Лейк-Кавана или индийский гетерозиготный), восковидный липофусциноз 7 типа (турецкий гетерозиготный), восковидный липофусциноз 8 типа (северная эпилепсия, эпилептическое интеллектуальное расстройство), восковидный липофусциноз 9, восковидный липофусциноз 10, восковидный липофусциноз 11, восковидный липофусциноз 12, восковидный липофусциноз 13, восковой липофусциноз 14. Нарушения функции органелл, связанные с лизосомами, включают, но без ограничения ими, болезнь Германски-Пудлака типа 1-го, болезнь Германски-Пудлака типа 2, болезнь Германски-Пудлака типа 3, болезнь Германски-Пудлака типа 4, болезнь Германски-Пудлака типа 5, болезнь Германски-Пудлака типа 6, болезнь Германски-Пудлака типа 7, болезнь Германски-Пудлака типа 8, болезнь Германски-Пудлака типа 9, синдром Грисцелли 1 (синдром Элежалде), синдром Грисцелли 2, болезнь Чедиака-Хигаси.

Введение лекарственного средства и применение в медицине

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится, в рамках здравого медицинского суждения, к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений при надлежащем соотношении польза/риск. В некоторых воплощениях к фармацевтически приемлемым соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам относятся те, которые одобрены регулирующим органом (таким как Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств Китая или Европейское агентство по лекарственным средствам), или те, которые перечислены в общепризнанных фармакопеях (таких как, Фармакопея США, Китайская фармакопея или Европейская фармакопея) для применения у животных (более конкретно у людей).

Используемый в данном документе термин «субъект» может охватывать как людей, так и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных, таких как млекопитающие и не-млекопитающие. «Субъект» может представлять собой домашний скот (такой как корова, свинья, овца, курица, кролик или лошадь), или грызун (такой как крыса или мышь), или примат (такой как горилла или обезьяна), или домашнее животное (такое как собака или кошка). «Субъект» может быть мужского или женского пола, а также может быть разного возраста. «Субъектами»-

людьми могут быть европеоиды, африканцы, азиаты, семиты или другие расы, или гибриды разных рас. «Субъектом»-человеком может быть пожилой человек, взрослый, подросток, ребенок или младенец.

В некоторых воплощениях субъектом в настоящем документе, является человек или примат, не являющийся человеком.

Дейтерированный оксид фениларсина, раскрытый в настоящем документе, можно вводить путями введения, известными в данной области, такими как инъекция (включая подкожную инъекцию, интраперитонеальную инъекцию, внутривенную инъекцию (капельную или инфузионную), внутримышечную инъекцию или внутрикожную инъекцию), или не инъекционное введение (включая пероральное введение, назальное введение, сублингвальное введение, ректальное введение или местное введение). В некоторых воплощениях описанный в данном документе дейтерированный оксид фениларсина вводят перорально, подкожно, внутримышечно или внутривенно. В некоторых воплощениях дейтерированный оксид фениларсина, описанный в настоящем документе, вводят перорально.

Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, которое может облегчать или устранять заболевание или симптом у субъекта, или превентивно подавлять или предупреждать возникновение заболевания или симптома. Терапевтически эффективное количество может представлять собой количество лекарственного средства, которое в некоторой степени облегчает одно или более заболеваний или симптомов субъекта; может представлять собой количество лекарственного средства, которое частично или полностью восстанавливает один или более физиологических или биохимических параметров, связанных с причиной заболевания или симптома, до нормы; и/или может представлять собой количество лекарственного средства, которое снижает вероятность заболевания или симптома. В некоторых воплощениях термин «терапевтически эффективное количество», используемый в настоящем документе, относится к количеству лекарственного средства, которое облегчает или устраняет заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка или лизосомной болезнью накопления у субъекта.

Терапевтически эффективное количество дейтерированного оксида фениларсина, предложенного в данном документе, зависит от различных факторов, известных в данной области, таких как масса тела, возраст, история болезни, получаемое в настоящее время лечение, состояние здоровья субъекта и сила, аллергия, гиперчувствительность и побочные эффекты взаимодействия между лекарственными средствами, путь введения и

степень прогрессирования заболевания. Специалист в данной области (например, врач или ветеринар) может соответственно снижать или увеличивать дозу в соответствии с этими или другими условиями или требованиями.

В некоторых воплощениях лечение дополнительно включает введение второго агента нуждающемуся в этом субъекту.

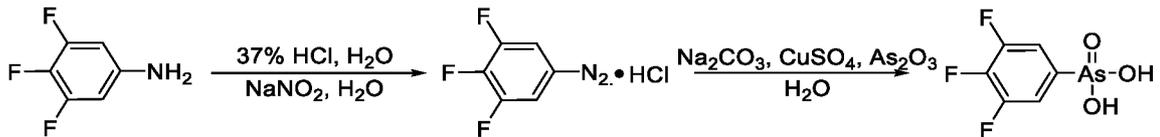
В некоторых воплощениях второй агент представляет собой агент для лечения заболеваний, связанных с неправильной внутриклеточной укладкой белка, включая, но без ограничения ими, леводопу, рилузол.

В некоторых воплощениях фторированный или дейтерированный оксид фениларсина вводят до, после или одновременно со вторым агентом.

Пример 1. Синтез галогенированных соединений и их физические свойства

1. Синтез и физико-химические свойства галогенированных соединений РАО

1.1 Получение 3,4,5-трифтор-РАО (сокращенно ФЗРАО)



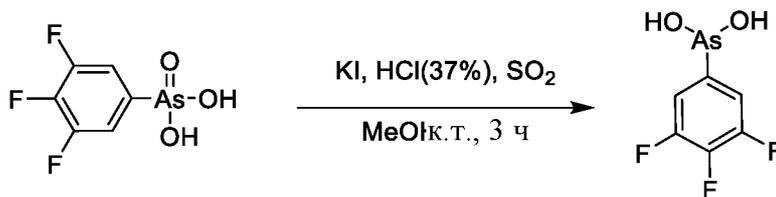
3,4,5-Трифторанилин (18 ммоль, 1,0 экв.) добавляли в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой, добавляли 5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре в реакционный раствор медленно добавляли 37%-ную соляную кислоту (4,1 мл, 41,5 ммоль), разбавляли 10 мл воды, и реакцию проводили при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO₂ (1,3 г, 18,9 ммоль, 10 мл H₂O), контролировали температуру реакции на уровне 0-5°C, и добавление водного раствора NaNO₂ завершали в течение 30-40 минут. Раствор становился желтым, и реакцию продолжали проводить при перемешивании при низкой температуре в течение 2 ч.

Na₂CO₃ (7,25 г, 68,4 ммоль, 3,8 экв.), As₂O₃ (3,6 г, 18,0 ммоль, 1,0 экв.), CuSO₄·5H₂O (0,27 г, 1,08 ммоль, 0,06 экв.) и H₂O (25 мл) добавляли в реакционную колбу объемом 100 мл и проводили реакцию при 95°C в течение 45 мин. Раствор представлял собой светло-голубую суспензию, и его охлаждали до 0-5°C.

Азогидрохлорид, приготовленный на стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на стадии 2, и температуру реакционной системы поддерживали ниже 5°C. В процессе добавления образовывалась пена, для удаления пены добавляли небольшое количество ацетона, и добавление продолжали после исчезновения пены. Добавление завершали в течение 1 часа, температура естественным образом повышалась после

завершения добавления, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи.

Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, и остаток на фильтре промывали ледяной водой (8 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 15 мл при 50°C. pH доводили до 8 путем добавления 2,8 мл 6 н. HCl по каплям в бане лед-вода, появившееся небольшое количество желтовато-коричневого твердого вещества отфильтровывали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество отбрасывали. Фильтрат доводили до pH 7 путем добавления по каплям 8 мл 6 н. HCl, и появившееся белое твердое вещество отфильтровывали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество собирали. Собранный фильтрат концентрировали до 11 мл, pH доводили до 3 путем добавления 1,5 мл 6 н. HCl, появившееся большое количество твердого вещества отфильтровывали, и твердое вещество собирали. pH маточного раствора доводили до 1 путем непрерывного добавления 3 мл 6 н. HCl по каплям. В системе появлялось серо-белое твердое вещество, его отфильтровывали, и твердую 3,4,5-трифторфениларсиновую кислоту собирали. Твердое вещество содержало продукт и неорганические соли, его не очищали и напрямую использовали на следующей стадии реакции.

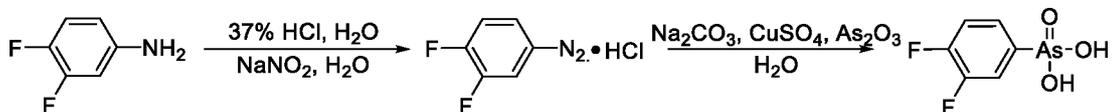


3,4,5-Трифторфениларсиновую кислоту (4,9 ммоль, 1,0 экв.), KI (18,7 мг, 0,11 ммоль, 0,023 экв.), 37%-ную HCl (1,8 мл, 22,5 ммоль, 4,6 экв.), MeOH (7 мл) последовательно добавляли в трехгорлую колбу объемом 25 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционную колбу непрерывно заполняли SO₂ в течение 3 часов и завершенность контролировали методом ТСХ (тонкослойная хроматография).

Реакционный раствор фильтровали и промывали MeOH (2 мл x 2). 7 мл 17%-ного раствора NaOH добавляли по каплям в жидкость на бане лед-вода, pH доводили до 7, и на стенках сосуда появлялось желтое масло. Органические фазы, экстрагированные этилацетатом (25 мл x 2), объединяли и сушили безводным NaSO₄, фильтровали и сушили центрифугированием при низкой температуре (20-28°C). Твердое вещество в сухом виде загружали на колонку, упакованную силикагелем на 7 см, и пропускали через эту колонку с использованием EA (этилацетат) в качестве элюента с получением примерно 500 мг жидкости. 500 мг жидкости переносили в круглодонную колбу объемом 25 мл, добавляли примерно 1 мл диэтилового эфира и энергично перемешивали шпателем с получением 350

мг белого твердого 3,4,5-трифтор-РАО. ^1H -ЯМР (δ , DMSO- d_6): 7.47 (t, 2H), 7.02 (s, 2H), МС-ЭРИ- (масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией с регистрацией отрицательных ионов) (m/z): 239,0 [(M-H)-].

1.2 Получение 3,4-дифтор-РАО (сокращенно F2oPAO)



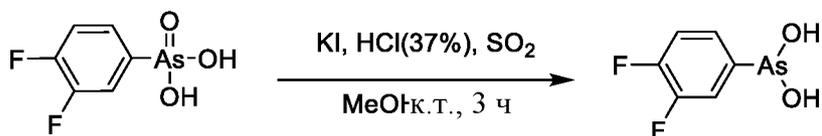
3,4-Дифторанилин (18 ммоль, 1.0 экв.) добавляли в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой, добавляли 5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре в реакционный раствор медленно добавляли 37%-ную соляную кислоту (4,1 мл, 41,5 ммоль), разбавляли 10 мл воды, и реакцию проводили при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO_2 (1,3 г, 18,9 ммоль, 10 мл H_2O), поддерживали температуру реакции 0-5°C, и добавление водного раствора NaNO_2 завершали в течение 30-40 минут. Раствор становился желтым, и реакцию продолжали при перемешивании при низкой температуре в течение 2 ч.

Na_2CO_3 (7,25 г, 68,4 ммоль, 3,8 экв.), As_2O_3 (3,6 г, 18,0 ммоль, 1,0 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,27 г, 1,08 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (25 мл) добавляли в реакционную колбу объемом 100 мл и проводили реакцию при 95°C в течение 45 мин. Раствор представлял собой сине-белую суспензию, и его охлаждали до 0-5°C.

Азогидрохлорид, приготовленный на стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на стадии 2, и температуру реакционной системы поддерживали ниже 5°C. В процессе добавления образовывалась пена, для удаления пены добавляли небольшое количество ацетона, и добавление продолжали после исчезновения пены. Добавление завершали в течение 1 часа, температура естественным образом повышалась после завершения добавления, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи.

Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, осадок на фильтре промывали ледяной водой (5 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 15 мл при 50°C. pH доводили до 8 путем добавления 1,4 мл 6 н. HCl по каплям в бане лед-вода, при этом появлялось небольшое количество желто-коричневого твердого вещества, его отфильтровывали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество отбрасывали. Фильтрат доводили до pH 7 путем добавления по каплям 3 мл 6 н. HCl , при этом появлялось белое твердое вещество, его отфильтровывали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество собирали. Собранный фильтрат концентрировали до 11 мл, pH доводили до 3 путем добавления 3 мл 6 н. HCl , появлялось большое количество

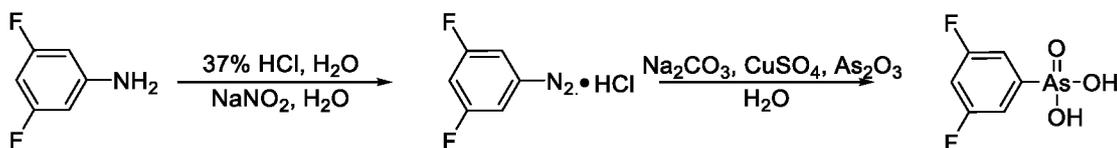
твердого вещества, его отфильтровывали, и твердое вещество собирали. pH маточного раствора довели до 1 путем добавления 1 мл 6 н. HCl по каплям. Появившееся в системе белое твердое вещество отфильтровывали. Маточный раствор промывали 2-3 раза, и твердое вещество собирали с получением 5,06 г 3,4-дифторфениларсиновой кислоты. Твердое вещество содержало продукт и неорганические соли, его не очищали и напрямую использовали на следующей стадии реакции.



3,4-Дифторфениларсоновую кислоту (6,4 ммоль, 1,0 экв.), KI (24,9 мг, 0,15 ммоль, 0,023 экв.), 37%-ную HCl (2 мл, 29,5 ммоль, 4,6 экв.), MeOH (8,6 мл) последовательно добавляли в трехгорлую колбу объемом 25 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционный сосуд непрерывно заполняли SO₂ в течение 3 часов, и реакцию контролировали методом ТСХ.

Реакционный раствор фильтровали и промывали MeOH (2 мл x 2). 8,5 мл 17%-ного раствора NaOH добавляли в жидкость на водяной бане с, pH довели до 7, и на стенках сосуда появлялась желтая жидкость. Органические фазы, экстрагированные этилацетатом (30 мл x 2), объединяли и сушили безводным NaSO₄, фильтровали и сушили при низкой температуре (20-28°C). Твердое вещество очищали колоночной хроматографией с получением примерно 200 мг жидкости. 200 мг жидкости переносили в круглодонную колбу объемом 25 мл, добавляли примерно 1 мл диэтилового эфира и перемешивали с получением 200 мг белого твердого 3,4-дифтор-РАО. ¹H-ЯМР (δ, DMSO-d₆): 7.47 (t, 1H), 7.45-7.43 (m, 2H), 6.89 (s, 2H). МС-ЭРИ⁺ (m/z): 221,0 [(M-H)⁺].

1.3 Получение 3,5-дифтор-РАО (сокращенно F2mРАО)



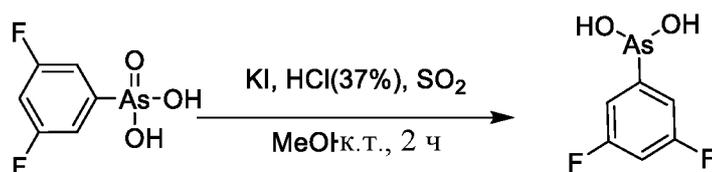
3,5-Дифторанилин (18 ммоль, 1,0 экв.) добавляли в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой, добавляли 5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре в реакционный раствор медленно добавляли 37%-ную соляную кислоту (4,1 мл, 41,5 ммоль), разбавляли 10 мл воды, добавляли 4,8 мл ацетона, и реакцию проводили при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO₂ (1,3 г, 18,9 ммоль, 10 мл H₂O), поддерживали температуру реакции 0-5°C, и добавление водного раствора NaNO₂ завершали в течение 30-40 минут. Дополнительно добавляли 5 мл ледяной воды. Раствор становился желто-

белым, и реакцию продолжали при перемешивании при низкой температуре в течение 2 ч.

Na_2CO_3 (7,25 г, 68,4 ммоль, 3,8 экв.), As_2O_3 (3,6 г, 18,0 ммоль, 1,0 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,27 г, 1,08 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (25 мл) добавляли в реакционную колбу объемом 100 мл, и реакцию проводили при 95°C в течение 45 мин. Раствор представлял собой сине-белую суспензию, и его охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$.

Азогидрохлорид, приготовленный на стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на стадии 2, и температуру реакционной системы поддерживали ниже 5°C . В процессе добавления образовывалась пена, и добавление продолжали после исчезновения пены. Добавление завершали в течение 1 часа, температура естественным образом повышалась после завершения добавления, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи.

Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, и осадок на фильтре промывали ледяной водой (5 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 25 мл при 50°C . pH доводили до 7-8 путем добавления 7,6 мл 6 н. HCl на бане лед-вода, при этом появлялось серое твердое вещество, его фильтровали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество отбрасывали. Полученный фильтрат концентрировали до 11 мл, и в системе появлялось желто-белое твердое вещество. Систему доводили до pH 3 путем добавления 3 мл 6 н. HCl , фильтровали, и полученное твердое вещество промывали 3 мл ледяной воды с получением 4,4 г твердой 3,5-дифторфениларсинной кислоты. Твердое вещество содержало продукт и неорганические соли, и его напрямую использовали на следующей стадии реакции.

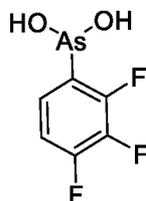


3,5-Дифторфениларсоновую кислоту (5,2 ммоль, 1,0 экв.), KI (20 мг, 0,12 ммоль, 0,023 экв.), 37%-ную HCl (2 мл, 24 ммоль, 4,6 экв.), MeOH (7 мл) последовательно добавляли в трехгорлую колбу объемом 25 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционный сосуд непрерывно заполняли SO_2 в течение 2 ч. Цвет раствора меняется с оранжево-желтого на желто-белый. Реакцию проводили в течение 2 часов, и завершенность контролировали методом ТСХ.

Реакционный раствор фильтровали и промывали MeOH (2 мл x 2). 6,7 мл 17%-ного раствора NaOH добавляли в жидкость по каплям на бане лед-вода, pH доводили до 7, и на стенках сосуда появлялась желтая маслянистая жидкость. Органические фазы, экстрагированные этилацетатом (25 мл x 2), объединяли и сушили безводным Na_2SO_4 ,

фильтровали и сушили центрифугированием при низкой температуре (20-28°C). 400 мг твердого вещества подвергали перекристаллизации с 4 мл этанола при 50-60°C с получением 240 мг твердого 3,5-дифтор-РАО, выход: примерно 20,8%. ^1H -ЯМР (δ , DMSO-d6): 7.28-7.18 (m, 3H), 6.98 (s, 2H). МС-ЭРИ (m/z): 221,0 [(M-H)].

1.4 Получение 2,3,4-трифтор-РАО



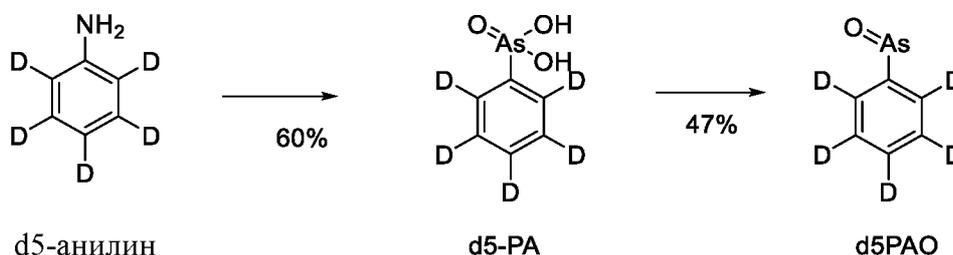
2,3,4-трифтор-РАО был получен способом, аналогичным способу получения 3,4,5-трифтор-РАО. ^1H -ЯМР (δ , DMSO-d6): 7.52-7.46 (m, 1H), 7.38-7.32 (m, 1H), 7.07 (s, 2H).

Пример 2. Синтез дейтерированных соединений и РАО и их физические свойства

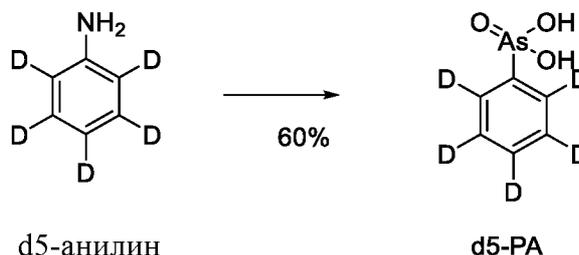
1. Синтез d5РАО (оксид пентадейтерофениларсина) и его физические свойства

1.2 Синтез d5РАО

Путь синтеза d5РАО следующий:



Стадия 1: Способ синтеза d5-РА:

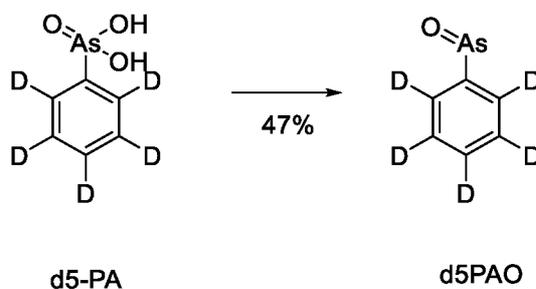


91,35 мл воды и 18,27 г d5-анилина добавляли в трехгорлую колбу, перемешивали, охлаждали до 0°C-10°C и добавляли по каплям 37,45 мл концентрированной соляной кислоты. После добавления соляной кислоты добавляли по каплям водный раствор нитрита натрия (13,43 г твердого нитрита натрия, растворенного в 36,5 мл воды) и поддерживали температуру не выше 5°C; добавление завершали, и температуру поддерживали в течение примерно 2-3 часов. Получение

дiazониевой соли завершено.

В другой сосуд добавляли 274 мл очищенной воды, 69,06 г карбоната натрия, 36,82 г триоксида мышьяка и 2,83 г пентагидрата сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), нагревали до 90-100°C и перемешивали при этой температуре в течение 30 минут, а затем охлаждали до 5-15°C. Diazониевую соль, полученную выше, медленно добавляли партиями, и температуру поддерживали ниже 15°C. Смесь перемешивали в течение 2-3 часов, затем оставляли естественным образом нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали водой. Фильтраты объединяли, и концентрировали соляную кислоту медленно добавляли до доведения pH системы до 3,0, при этом осаждалось небольшое количество коричневого флокулянта. Смесь фильтровали, фильтрат трижды промывали 100 мл этилацетата, и водную фазу концентрировали при пониженном давлении при 50-60°C примерно до 170 мл, при этом осаждалось большое количество белого твердого вещества. Смесь фильтровали, осадок на фильтре промывали холодной водой, воду отводили, и твердое вещество напрямую высушивали в воздуходувной печи при 50°C в течение 18 ч. Было получено 35 г не совсем белого твердого вещества, d5-PA, выход: 90,83 %, МС-ЭРИ+ (масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией с регистрацией положительных ионов) (m/z): 208,0 [(M+H)⁺].

Стадия 2: Способ синтеза d5PAO (или d5-PAO):



400 мл очищенной воды, 25 г d5-PA, 75,4 г бисульфита натрия, 0,32 г йодида калия и 125 мл метанола добавляли в трехгорлую колбу и перемешивали; реакцию проводили при 30-40°C в течение ночи, и реакцию останавливали, когда исходные вещества прореагировали по существу полностью. Температуру раствора поддерживали ниже 30°C, и pH доводили до 7,0 концентрированной соляной кислотой. Раствор экстрагировали этилацетатом 4 раза, и органические фазы объединяли, экстрагировали и концентрировали досуха при 35-45°C с получением 20 г белого твердого влажного продукта. Твердое вещество нагревали с обратным холодильником с 240 мл *трет*-бутилметилового эфира при повышенной температуре

в течение 1 ч, охлаждали, фильтровали, и осадок на фильтре промывали холодным МТВЕ (метил-*трет*-бутиловый эфир). Осадок на фильтре сушили в течение ночи при 50°C в воздуходувной печи с получением 8,7 г белого твердого вещества, d5РАО, ¹³С-ЯМР (δ, DMSO-d₆): 149.9, 129.6, 129.4, 128.2, МС-ЭРИ+ (m/z): 173,99 [(M+H)⁺].

1.3 Физико-химические свойства d5РАО

1.2.1 Приборы

Agilent 1260 Prime HPLC, весы Mettler Toledo XS105 (0,01 мг), ультразвуковой прибор KQ5200B (Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.), осциллятор с регулируемой частотой BR2000-GM (VWR International), фильтрующая мембрана 0,45 мкм (Shanghai Qingyang Biotechnology Co., Ltd.)

1.2.2 Экспериментальное лекарственное средство

d5РАО (чистота 97,9%), ацетонитрил хроматографической чистоты (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.), соляная кислота, DMSO аналитической чистоты (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.).

1.2.3 Приготовление раствора

Брали 2 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и разбавляли до 20 мл добавлением деионизированной воды с получением 0,01 М раствора соляной кислоты. С использованием индикаторной бумаги для определения рН было определено, что рН раствора был равным 2.

Брали 2 мл 0,01 М раствора соляной кислоты и разбавляли до 20 мл добавлением деионизированной воды с получением 0,001 М раствора соляной кислоты.

Брали 2 мл 0,001 М раствора соляной кислоты и разбавляли до 20 мл добавлением деионизированной воды с получением 0,0001 М раствора соляной кислоты. С использованием индикаторной бумаги для определения рН было определено, что рН раствора был равен 4.

Брали 20 мл деионизированной воды и определяли, что рН равен 6.

7,5 мг d5РАО вносили в центрифужную пробирку, добавляли 1 мл DMSO, обрабатывали ультразвуком и растворяли. Затем раствор разбавляли до 10 мл смесью ацетонитрил/вода (1/1) с получением 0,75 мг/мл исходного раствора d5РАО. Исходный раствор d5РАО разводили с получением разных рабочих растворов d5РАО в концентрациях 0,3 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,075 мг/мл, 0,03 мг/мл и 0,015 мг/мл.

1.2.4 Хроматографические условия

Жидкостной хроматограф: система ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1260 Infinity II Prime.

Колонка: ACQUITY UPLC® Peptide C18 130Å 2,1x100 мм в.д.(внутренний диаметр), 1,7 мкм (Waters).

Подвижная фаза А: Вода:ACN (об.:об., 95:5) раствор, содержащий 0,01% AA (уксусная кислота) и 2 ммоль/л NH₄OAc.

Подвижная фаза В: Вода:ACN (об.:об., 5:95) раствор, содержащий 0,01% AA и 2 ммоль/л NH₄OAc.

Градиент элюирования:

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	А (%)	В (%)
Начальное	0,400	95	5
2,0	0,400	2	98
3,0	0,400	2	98
3,20	0,400	95	5
4,0	0,400	95	5

Температура колонки: 40°C

Инжектируемый объем: 4 мкл

Длина волны детектирования: 254 нм

1.2.5 Методологическое исследование

Исследование линейных зависимостей

Разные растворы d5РАО в концентрациях 0,75 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,075 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,015 мг/мл инжектировали, проводили измерения в соответствии с вышеуказанными хроматографическими условиями и регистрировали хроматограммы. Осуществляли линейную регрессию концентрации образца по площади пика с получением уравнения регрессии:

$$y = 1647,7x + 0,9623, R^2 = 0,9999.$$

Результаты показали хорошую линейную зависимость между концентрацией образца d5РАО и площадью пика в диапазоне 0,015-0,75 мг*мл⁻¹.

1.2.6 Определение равновесной растворимости

По 2 мл буферов с разным рН аспирировали и помещали в центрифужные пробирки объемом 3 мл, добавляли избыточное количество порошка d5РАО до тех пор, пока в растворе не появлялось большое количество белого нерастворимого осадка, проводили ультразвуковую обработку в течение 30 мин, затем помещали в термостатический осциллятор и встряхивали в течение 24 ч при 25°C, затем обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин, фильтровали через фильтрующую мембрану 0,45 мкм, и фильтрат аспирировали и разбавляли водой в 10 раз, а затем

инжектировали и определяли в соответствии с вышеуказанными хроматографическими условиями. Регистрировали хроматограмму, и было вычислено, что растворимость d5РАО в буферах с разным рН была равной 5,36 мг/мл, 5,39 мг/мл и 5,98 мг/мл соответственно.

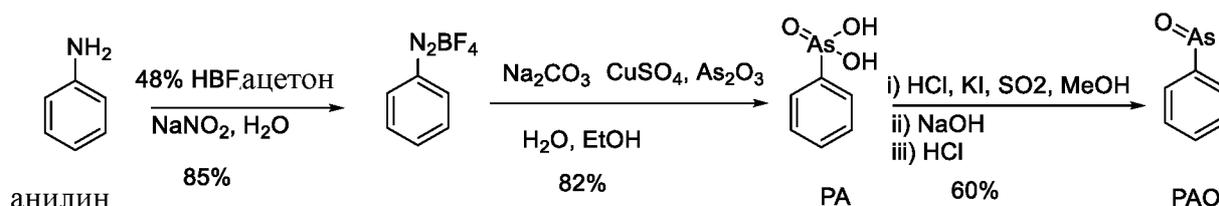
Таблица 1. Растворимость d5РАО

Лекарственное средство	рН	Площадь пика	Соответствующая растворимость (мг/мл)
d5РАО	6	884,20	5,36
d5РАО	4	889,51	5,39
d5РАО	2	986,70	5,98

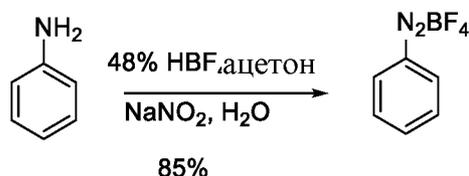
2. Синтез и физические свойства РАО

2.1 Синтез РАО

Пусть синтеза:

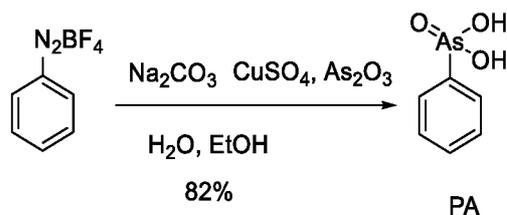


Стадия 1:



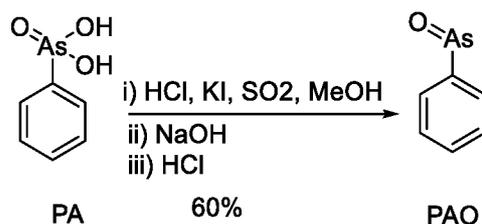
Анилин (10,0 г, 107 ммоль, 1,0 экв.) и ацетон (20 мл) добавляли в одnogорлую колбу объемом 250 мл. Раствор охлаждали до примерно $-15^\circ C$ (высокие температуры приводят к более темному цвету продукта) и медленно добавляли 48% HBF_4 (30 мл, 29,5 г, 161 ммоль, 1,5 экв.). $NaNO_2$ (11,0 г, 161 ммоль, 1,5 экв.) растворяли в H_2O (20 мл) и медленно добавляли по каплям в вышеуказанный раствор. После добавления реакцию проводили при $-15^\circ C$ в течение 2 ч, затем перемешивали при $0^\circ C$ примерно 1 ч. Твердое вещество (белое) фильтровали и промывали изопропиловым эфиром (50 мл x 2). Продукт сушили в вакууме (температура $30^\circ C$), масса: 17,5 г, выход: 85%, розовое твердое вещество, и напрямую использован на следующей реакционной стадии.

Стадия два:



В колбу объемом 250 мл добавляли Na_2CO_3 (21,2 г, 200,6 ммоль, 3,85 экв.), As_2O_3 (11,3 г, 57,3 ммоль, 1,1 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (800 мг, 3,13 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (60 мл), и суспензию нагревали до примерно 90°C и выдерживали в течение примерно 20 минут для растворения большей части твердого вещества. Охлажденную до примерно 0°C - 15°C суспензию азобензофторбората (10,0 г, 52,1 ммоль, 1,0 экв.) и H_2O (60 мл) добавляли медленно порциями, и небольшое количество ацетона добавляли для снижения пенообразования. После добавления смесь перемешивали в течение примерно 12 ч при комнатной температуре. Наносили диатомитовую землю, смесь фильтровали и промывали H_2O (20 мл x 3), и фильтрат обесцвечивали добавлением активированного угля, если цвет был слишком темным, и фильтровали. Концентрированную соляную кислоту (12 н., 40 мл) добавляли в фильтрат для его нейтрализации, и реакционный раствор дополнительно доводили до кислотного. Фильтрат концентрировали до объема смеси примерно 50 мл. Твердое вещество фильтровали и промывали один раз холодной водой; фильтрат концентрировали, и полученное твердое вещество фильтровали и промывали один раз холодной водой. Твердое вещество объединяли и сушили с получением белого твердого вещества, масса: 8,6 г, выход: 82%. МС-ЭРИ⁺ (m/z): 202,9 [(M+H)⁺].

Стадия 3:



В смесь фениларсиновой кислоты (8,0 г, 40 ммоль, 1,0 экв.), метанола (40 мл), концентрированной соляной кислоты (15 мл) и каталитического количества KI (50 мг) подавали SO_2 до насыщения и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Раствор NaOH (2 н.) добавляли в смесь до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. Концентрированную соляную кислоту добавляли для нейтрализации. Твердое вещество осаждали и фильтровали с получением белого твердого вещества. Твердое вещество подвергали перекристаллизации со смесью вода/этанол (1/5) и сушили. Масса: 4,0 г, выход: 60%. Продукт представляет собой

белое порошкообразное твердое вещество. $^1\text{H-NMR}$ (δ , CDCl_3): 7.41-7.62 (m, 3H), 7.75-7.78 (m, 2H). MS-ЭРИ^+ (m/z): 168,8 [(M+H) $^+$].

2.2 Физико-химические свойства РАО

Молекулярная формула РАО: $\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}$; молекулярная масса 168,03.

2.2.1 Приборы

Agilent 1260 Prime HPLC, весы Mettler Toledo XS105 (0,01 мг), ультразвуковой прибор KQ5200B (Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.), осциллятор с регулируемой частотой BR2000-GM (VWR International), фильтрующая мембрана 0,45 мкм (Shanghai Qingyang Biotechnology Co., Ltd.)

2.2.2 Экспериментальное лекарственное средство

РАО (чистота 98%), ацетонитрил хроматографической чистоты (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.), соляная кислота, DMSO аналитической чистоты (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.).

2.2.3 Приготовление растворов

Брали 2 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и разбавляли до 20 мл деионизированной водой с получением 0,01 М раствора соляной кислоты. pH раствора определяли равным 2 с использованием точной бумаги для определения pH.

Брали 2 мл 0,01 М раствора соляной кислоты и разбавляли до 20 мл деионизированной водой с получением 0,001 М раствора соляной кислоты.

Брали 2 мл 0,001 М раствора соляной кислоты и разбавляют до 20 мл деионизированной водой с получением 0,0001 М раствора соляной кислоты. С использованием индикаторной бумаги для определения pH было определено, что pH раствора равен 4.

Брали 20 мл деионизированной воды, и было определено, что pH равен 6.

7,5 мг РАО помещали в центрифужную пробирку, добавляли 1 мл DMSO, обрабатывали ультразвуком и растворяли. Затем раствор разбавляли до 10 мл смесью ацетонитрил/вода (1/1) с получением 0,75 мг/мл исходного раствора РАО. Исходный раствор РАО разводили с получением рабочих растворов РАО в концентрациях 0,3 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,075 мг/мл, 0,03 мг/мл и 0,015 мг/мл.

2.2.4 Хроматографические условия

Жидкостной хроматограф: система ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1260 Infinity II Prime.

Колонка: ACQUITY UPLC® Peptide C18 130Å 2.1x100 мм в.д., 1,7 мкм (Waters).

Подвижная фаза А: Вода:ACN (об.:об., 95:5) раствор, содержащий 0,01% AA и

2 ммоль/л NH₄OAc.

Подвижная фаза В: Вода:ACN (об.:об., 5:95) раствор, содержащий 0,01% AA и 2 ммоль/л NH₄OAc.

Градиент элюирования:

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	A (%)	B (%)
Начальное	0,400	95	5
2,0	0,400	2	98
3,0	0,400	2	98
3,20	0,400	95	5
4,0	0,400	95	5

Температура колонки: 40°C

Инжектируемый объем: 4 мкл

Длина волны детектирования: 254 нм

2.2.5 Методологическое исследование

Исследование линейных зависимостей

Брали растворы РАО в разных концентрациях 0,75 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,075 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,015 мг/мл, инжектировали, проводили измерения в соответствии с вышеуказанными хроматографическими условиями и регистрировали хроматограммы. Осуществляли линейную регрессию концентрации образца по площади пика с получением уравнения регрессии:

$$y = 1834,8x - 4,2355, R^2=1$$

Результаты показали хорошую линейную зависимость между концентрацией РАО в образце и областью пика в диапазоне 0,015-0,75 мг*мл⁻¹.

2.2.6 Определение равновесной растворимости

По 2 мл различных рН-буферов аспирировали и помещали в центрифужные пробирки объемом 3 мл, и избыточное количество порошка РАО добавляли до тех пор, пока в растворе не появлялось большое количество белого нерастворимого осадка, обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин, затем помещали в термостатический осциллятор и встряхивали в течение 24 ч при 25°C, затем обрабатывали ультразвуком течение 30 мин и фильтровали через фильтрующую мембрану 0,45 мкм, и фильтрат аспирировали и разбавляли водой в 10 раз, а затем инжектировали и определяли в соответствии с вышеуказанными хроматографическими условиями. Хроматограмму регистрировали, и было вычислено, что растворимость РАО в буферах с различным рН равна 1,15 мг/мл, 3,38

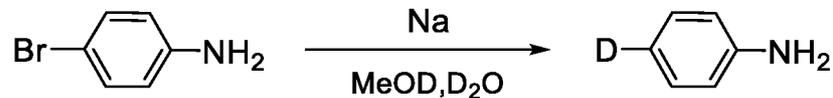
мг/мл и 4,52 мг/мл соответственно.

Таблица 2. Растворимость РАО

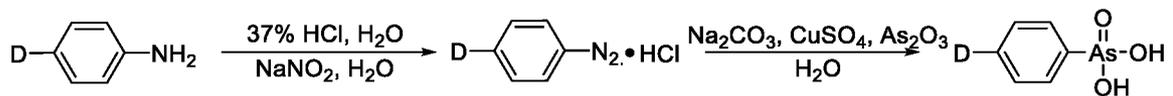
Лекарственное средство	pH	Площадь пика	Соответствующая растворимость (мг/мл)
РАО	6	207,25	1,15
РАО	4	616,40	3,38
РАО	2	824,35	4,52

3. Синтез и физико-химические свойства дейтерированных соединений d1РАО, d2РАО и d3РАО

3.1 Получение d1РАО

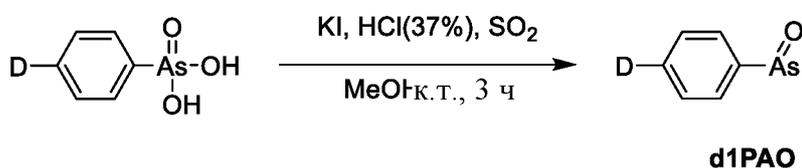


В атмосфере азота *пара*-броманилин (3,44 г) растворяли в дейтерированном метаноле (5 мл), нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут, сушили центрифугированием, повторяли 3 раза, сушили центрифугированием и дренировали для использования. 3 г металлического натрия добавляли к дейтерированному метанолу (10 мл) порциями, и после завершения реакции медленно добавляли тяжелую воду (30 мл) с получением 10%-ного раствора оксида дейтерида натрия в тяжелой воде. В атмосфере азота продукт первой стадии растворяли в дейтерированном метаноле (5 мл), добавляли цинковый порошок (6,5 г), и полученный 10%-ный раствор оксида дейтерида натрия в тяжелой воде нагревали и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч, контролировали исчезновение *пара*-броманилина на многолуночном планшете, охлаждали до комнатной температуры, экстрагировали диэтиловым эфиром и сушили центрифугированием с при низкой температуре с получением продукта, *пара*-дейтеранилина.



пара-Дейтеранилин (0,94 г), полученный на вышеописанной стадии, добавляли в круглодонную колбу с магнитной мешалкой, добавляли 5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре медленно добавляли 37%-ный раствор соляной кислоты (2 мл), разбавляли 5 мл воды, и реакцию проводили при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO₂ (724,5 мг, 10,5 ммоль, 3 мл H₂O), поддерживали температуру реакции 0-5°C, и добавление

завершали в течение 30-40 минут. Раствор становился коричнево-желтым, и реакцию продолжали при перемешивании при низкой температуре в течение 2 ч. В другую круглодонную реакционную колбу добавляли Na_2CO_3 (4,0 г, 38,0 ммоль, 3,8 экв.), As_2O_3 (1,0 г, 5,0 ммоль, 0,5 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (150 мг, 0,6 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (13 мл), и реакцию проводили при 95°C в течение 45 мин. Раствор становился зеленым, и его охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$. Азогидрохлорид, полученный на Стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на Стадии 2, при этом температуру реакционной системы поддерживали ниже 5°C ; в ходе добавления образовывалась пена, для удаления пены добавляли небольшое количество ацетона, и добавление продолжали после исчезновения пены. Добавление завершали в течение 1 часа, температура естественным образом повышалась после завершения добавления, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи. Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, и осадок на фильтре промывали ледяной водой (2 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 10 мл при 50°C . pH доводили до 7-8 добавлением по каплям 4 мл 6 н. HCl на бане лед-вода, появлялось небольшое количество желто-коричневого твердого вещества, его фильтровали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество отбрасывали. Фильтрат доводили до pH 2-3 добавлением 2,5 мл 6 н. HCl , при этом образовывалось большое количество пузырьков. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, охлаждали и фильтровался при появлении в системе большого количества твердого вещества, и это твердое вещество собирались. Полученный фильтрат доводили до pH 1 добавлением 6 н. HCl , упаривали на роторном испарителе, затем охлаждали и фильтровали при появлении в системе большого количества твердого вещества. Маточный раствор дважды промывали, и твердое вещество собирали. Всего было получено 900 мг чистой твердой *para*-дейтерофениларсиновой кислоты, выход: 44 %. ^1H -ЯМР (δ , DMSO-d_6): 7.60 (d, 2H), 7.53 (d, 2H).



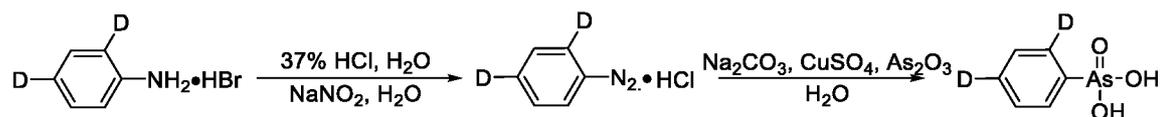
para-Дейтерофениларсиновую кислоту (880 мг, 4,3 ммоль, 1,0 экв.), йодид калия (16,6 мг, 0,1 ммоль, 0,023 экв.), 37% HCl (1,7 мл, 20,0 ммоль, 4,6 экв.), MeOH (5,8 мл) последовательно добавляли в трехгорлую колбу объемом 25 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционный раствор непрерывно насыщали SO_2 в течение 3 ч, и завершенность контролировали методом ТСХ. Реакционный раствор фильтровали и промывали MeOH (1,5 мл x 2). В жидкость в бане лед-вода добавляли по

каплям 15%-ный раствор NaOH, и pH довели до 14; система представляла собой оранжевую суспензию. Органические фазы, экстрагированные этилацетатом (50 мл x 2), объединяли и сушили с использованием безводного Na₂SO₄, фильтровали и сушили центрифугированием при низкой температуре (20-28°C) с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растирали с примерно 4 мл диэтилового эфира в течение примерно 30 мин и затем фильтровали и дренировали с получением примерно 430 мг d1PAO в виде не совсем белого твердого вещества, выход: примерно 59%. ¹H-ЯМР (δ, DMSO-d₆): 7.70 (d, 2H), 7.46 (d, 2H), МС-ЭРИ⁺ (m/z): 169,9 [(M+H)⁺].

3.2 Получение d2PAO

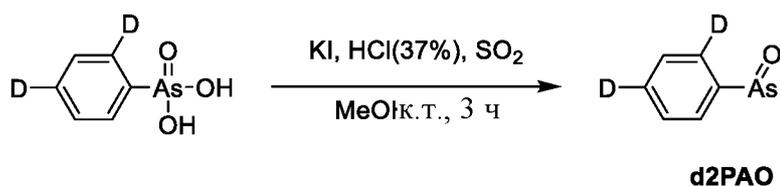


Концентрированную соляную кислоту (5 мл) добавляли по каплям к раствору *орто*-броманилина в диэтиловом эфире (3,44 г), образовавшееся твердое вещество фильтровали через воронку, заполненную песком, промывали диэтиловым эфиром и сливали с получением гидрохлорида анилина. Твердое вещество растворяли в тяжелой воде (7 мл) в закрытой пробирке под азотом, нагревали до 120°C, подвергали реакции в течение 24 ч, тяжелую воду удаляли центрифугированием, продували азотом, повторно вводили тяжелую воду (7 мл), и реакцию проводили в течение 48 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры, pH довели до pH = 7 с использованием 30%-ного гидроксида натрия, экстрагировали диэтиловым эфиром, сушили над безводным сульфатом натрия и сушили центрифугированием с получением 2-бром-4,6-дидейтерио-анилина. Под азотом 22 мл метанола добавляли в смесь 2-бром-4,6-дидейтерий-анилина и 10% Pd/C (300 мг), азот замещали водородом, и реакцию проводили в течение 3 ч. Систему контролировали с использованием многолучночного планшета до исчезновения 2-бром-4,6-дидейтерий-анилина, фильтровали через диатомитовую землю, промывали небольшим количеством метанола и напрямую сушили центрифугированием с получением гидробромидной соли 2,4-дидейтерий-анилина.



Гидробромидную соль 2,4-дидейтерий-анилина, полученную на стадии, описанной выше, добавляли в круглодонную колбу объемом 25 мл с магнитной мешалкой, добавляли 5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре медленно добавляли 37%-ную соляную кислоту (1,1 мл), разбавляли 5 мл воды, и

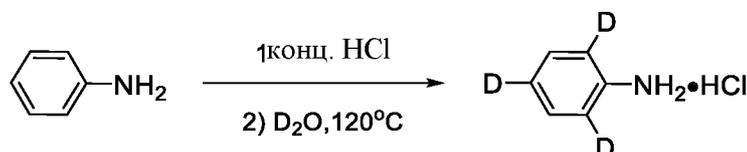
реакцию проводили при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO_2 (724,5 мг, 10,5 ммоль, 3 мл H_2O), поддерживали температуру реакции $0-5^\circ\text{C}$, и добавление завершали в течение 30-40 минут. Раствор становился коричнево-желтым, и реакцию продолжали при перемешивании при низкой температуре в течение 2 ч. В реакционную круглодонную колбу объемом 50 мл добавляли Na_2CO_3 (4,0 г, 38,0 ммоль, 3,8 экв.), As_2O_3 (1,0 г, 5,0 ммоль, 0,5 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (150 мг, 0,6 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (13 мл), и реакцию проводили при 95°C в течение 45 мин. Раствор становился зеленым, и его охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$. Азогидрохлорид, полученный на стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на стадии 2, при этом поддерживали температуру реакционной системы ниже 5°C ; в ходе добавления образовывалась пена, для удаления пены добавляли небольшое количество ацетона, и добавление продолжали после исчезновения пены. Добавление завершали в течение 1 часа, после завершения добавления температура естественным образом повышалась, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи. Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, и осадок на фильтре промывали ледяной водой (2 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 10 мл при 50°C . pH доводили до 7-8 добавлением 4 мл 6 н. HCl по каплям на бане лед-вода, при этом появлялось небольшое количество желто-коричневого твердого вещества, его фильтровали, промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество отбрасывали. Фильтрат доводили до pH 3-4 добавлением 2 мл 6 н. HCl , при этом появлялось вязкое твердое вещество. Систему фильтровали, и твердое вещество отбрасывали (ЯМР показал, что это твердое вещество не содержит продукта). Полученный фильтрат концентрировали до 8 мл, pH доводили до 2-3 добавлением 6 н. HCl (0,5 мл), при этом появлялось большое количество твердого вещества, и систему фильтровали с получением 1,15 г сухого вещества 2,4-дидейтерий-бензоларсоновой кислоты, выход: 56,4%. ^1H -ЯМР (δ , DMSO-d_6): 7.72 (d, 1H), 7.56-7.59 (m, 2H).



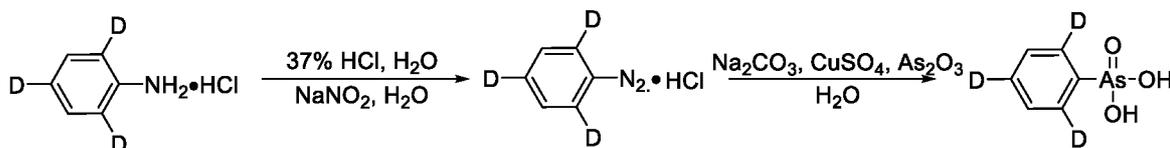
2,4-Дидейтерий-бензоларсоновую кислоту (1,1 г, 5,4 ммоль, 1,0 экв.), KI (20,6 мг, 0,124 ммоль, 0,023 экв.), 37% HCl (2,1 мл, 25,0 ммоль, 4,6 экв.) и MeOH (7,3 мл) последовательно добавляли в трехгорлую колбу объемом 25 мл и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционный раствор непрерывно

насыщали SO_2 в течение 3 ч, и завершенность контролировали методом ТСХ. pH доводили до 7 добавлением по каплям 15%-ного раствора NaOH на бане лед-вода, и в системе появлялось большое количество нерастворимого вещества. Систему экстрагировали этилацетатом (50 мл x 2), органические фазы объединяли и сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и сушили центрифугированием при низкой температуре (20-28°C) с получением неочищенного продукта. Примерно 3 мл этилацетата добавляли к неочищенному продукту и растирали в течение примерно 30 мин, затем фильтровали и дренировали с получением не совсем белого твердого d_2PAO (примерно 400 мг), выход: примерно 48%. ^1H -ЯМР (δ , DMSO-d_6): 7.58 (d, 1H), 7.36-7.39 (m, 2H). МС-ЭРИ+ (m/z): 170,7 [(M+H)+].

3.3 Получение d_2PAO

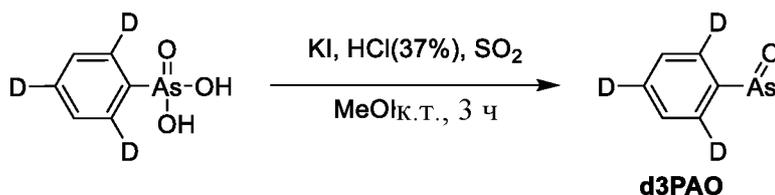


Концентрированную соляную кислоту (5 мл) добавляли по каплям в раствор анилина (2,65 г анилина, 7 мл тяжелой воды), образовывалось твердое вещество, его фильтровали через воронку, заполненную песком, промывали диэтиловым эфиром и осушали с получением гидрохлорида анилина, который напрямую использовали на следующей стадии. Твердое вещество растворяли в тяжелой воде (7 мл) в закрытой пробирке под азотом, нагревали до 120°C и проводили реакцию в течение 24 ч. Тяжелую воду удаляли центрифугированием, вводили азот и повторно вводили тяжелую воду (7 мл) и проводили реакцию в течение 48 ч. Полученный раствор 2,4,6-тридейтерий-анилина в тяжелой воде напрямую использовали на следующей стадии.



Раствор 2,4,6-тридейтерий-анилина в тяжелой воде (4,33 мл) добавляли в круглодонную колбу объемом 25 мл с магнитной мешалкой, добавляли 2,5 мл воды и охлаждали до 0-5°C. При этой температуре медленно добавляли 37%-ный раствор соляной кислоты (1,1 мл), разбавляли 5 мл воды и проводили реакцию при непрерывном перемешивании в течение 30 минут. Затем в реакционный раствор медленно добавляли водный раствор NaNO_2 (724,5 мг, 10,5 ммоль, 3 мл H_2O), поддерживали температуру реакции 0-5°C, и добавление завершали в течение 30-40 минут. Цвет раствора менялся с фиолетового на желтый, и реакцию продолжали при перемешивании при низкой

температуре в течение 2 ч. В реакционную круглодонную колбу объемом 50 мл добавляли Na_2CO_3 (4,0 г, 38,0 ммоль, 3,8 экв.), As_2O_3 (1,0 г, 5,0 ммоль, 0,5 экв.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (150 мг, 0,6 ммоль, 0,06 экв.) и H_2O (13 мл), и реакцию проводили при 95°C в течение 45 мин. Раствор был зеленым, и его охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$. Азогидрохлорид, полученный на стадии 1, медленно добавляли в реакционный раствор на стадии 2, при этом поддерживали температуру реакционной системы ниже 5°C ; в ходе добавления образовывалась пена, для удаления пены добавляли небольшое количество ацетона, и после исчезновения пены добавление продолжали. Добавление завершали в течение 1 часа; после завершения добавления температура естественным образом повышалась, и реакционный раствор перемешивали в течение ночи. Реакционный раствор фильтровали через диатомитовую землю, осадок на фильтре промывали ледяной водой (2 мл x 2). Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до 10 мл при 50°C . pH доводили до 7-8 добавлением 1,8 мл 6 н. HCl по каплям на бане лед-вода, при этом появлялось небольшое количество желто-коричневого твердого вещества, его фильтровали, промывали 2 мл ледяной воды и отбрасывали. Фильтрат доводили до pH 3 добавлением 1,8 мл 6 н. HCl , появлялось светло-желтое твердое вещество. Систему фильтровали и промывали 2 мл ледяной воды, и твердое вещество собирали. Полученный фильтрат концентрировали до 8 мл, pH доводили до 1 добавлением 6 н. HCl (0,8 мл), появлялось большое количество твердого вещества, его отфильтровывали, и твердое вещество собирали. Всего было получено 860 мг твердой 2,4,6-тридейтерий-фениларсоновой кислоты. Выход: 39 %. $^1\text{H-NMR}$ (δ , DMSO-d_6): 7.56 (s, 2H).



В трехгорлую колбу объемом 25 мл последовательно добавляли 2,4,6-тридейтерий-фениларсоновую кислоту (3,9 ммоль, 1,0 экв.), йодид калия (15 мг, 0,09 ммоль, 0,023 экв.), 37% HCl (1,3 мл, 18,0 ммоль, 4,6 экв.), MeOH (5,3 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакционный раствор непрерывно насыщали SO_2 в течение 3 ч, и завершенность контролировали методом ТСХ. Реакционный раствор фильтровали и промывали метанолом (1,5 мл x 2). pH доводили до 7 добавлением по каплям 4,3 мл 17%-ного раствора NaOH на бане лед-вода, и на стенках колбы появлялось желтое масло. Систему экстрагировали этилацетатом (25 мл x 2), органические фазы объединяли и сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и сушили центрифугированием при низкой температуре (20-

28°C). Примерно 3 мл этилацетата добавляли к полученному твердому веществу и подвергали вибрации в течение примерно 30 минут, затем фильтровали и дренировали с получением не совсем белого твердого вещества d3PAO (примерно 200 мг). Маточный раствор, полученный на предыдущей стадии, сушили центрифугированием, и к полученному твердому веществу добавляли примерно 1,5 мл Et₂O и вибрировали в течение примерно 30 минут, затем фильтровали и осушали с получением не совсем белого твердого вещества d3PAO (примерно 170 мг). d3PAO объединяли с получением выхода примерно 55%. ¹H-ЯМР (δ, DMSO-d₆): 7.46 (s, 2H). МС-ЭРИ⁺ (m/z): 171,9 [(M+H)⁺].

Пример 3. Фармакокинетические исследования соединений

F2mPAO был получен способом, описанным в Примере 1, а d5PAO (d5-PAO) и PAO (PAO) были получены способом, описанным в Примере 2. После однократной внутривенной инъекции PAO, d5PAO и F2mPAO (вводили в дозе 0,1 мг/кг, соединения были растворены в 0,1% DMSO) или однократного введения через пероральный зонд смеси вышеуказанных реагентов (вводили в дозе 0,2 мг/кг) у тестируемой взрослой крысы-самца брали венозную кровь через 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 32 и 48 часов соответственно после введения для фармакокинетического тестирования. PAO и d5PAO в тестируемых образцах экстрагировали методом осаждения белков, и обработанные образцы подвергали жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) и детектировали в режиме ЭРИ (электрораспылительная ионизация) с регистрацией отрицательных ионов после разделения жидкой фазы.

Обработка образцов (образцы крови)

1) В 96-луночный планшет добавляли по 40 мкл образцов неизвестного вещества, калибровочного стандарта, контроля качества, одинарного холостого контроля и двойного холостого контроля;

2) 120 мкл димеркаптопропансульфоната натрия, растворенного в воде 0,1 мг/мл, добавляли к каждому образцу;

3) по 40 мкл 0,2%-ной муравьиной кислоты, растворенной в воде, добавляли к каждому образцу. Образцы тщательно смешивали и инкубировали при 45°C в течение 15 минут при встряхивании и центрифугировали при 4°C в течение 5 минут (x3220 g);

4) каждый образец (за исключением двойных холостых контролей) гасили 200 мкл IS1 (образцы двойного холостого контроля гасили 240 мкл MeOH), встряхивали и смешивали в течение 15 минут, и затем центрифугировали при 4°C в течение 15 минут (x3220 g);

5) 50 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-луночный планшет и центрифугировали при 4°C в течение 5 минут (x3220 g), затем надосадочную жидкость использовали для анализа методом ЖХ-МС/МС. Анализ осуществляли на системе Triple Quad 6500⁺ LC-MS/MS (SCIEX).

Результаты:

Самцам крыс SD (n=3) вводили одинаковые дозы PAO, d5PAO и F2mPAO однократно внутривенной инъекцией (0,1 мг/кг) или однократно через пероральный зонд (0,2 мг/кг), и значимые различия в фармакокинетических (ПК) параметрах PAO и d5PAO отсутствовали. Однако F2mPAO был значительно лучше, чем PAO и d5PAO, с точки зрения биодоступности, максимальной концентрации в крови, периода полувыведения и системного воздействия (см. Таблицу 3, Таблицу 4 и Фиг. 1 и Фиг. 2).

ПК параметры	PAO (0,11 мг/кг, в.в.)			F2mPAO (0,08 мг/кг, в.в.)			d5PAO (0,09 мг/кг, в.в.)		
	Сред- нее	SD	CV (%)	Сред- нее	SD	CV (%)	Сред- нее	SD	CV (%)
Кол-во точек, использо- ванных для T _{1/2}	3	--	--	3	--	--	3,00	--	--
C ₀ (нг/мл)	1345	211	15,7	1943	375	19,3	1488	142	9,53
T _{1/2} (ч)	11,4	0,300	2,63	17,0	2,858	16,81	12,4	0,651	5,23
Vd _{ss} (л/кг)	0,163	0,0161	9,88	0,155	0,0104 4	6,74	0,155	0,0219	14,1
CL (мл/мин/кг)	0,411	0,0256	6,22	0,239	0,0046	1,92	0,379	0,0230	6,07
T _{last} (ч)	48,0	--	--	48,0	--	--	48,0	--	--
AUC _{0-last} (нг.ч/мл)	4010	253	6,30	6636	58	0,88	4337	281	6,47
AUC _{0-inf} (нг.ч/мл)	4062	258	6,35	6976	145	2,08	4404	276	6,26
MRT _{0-last} (ч)	5,84	0,436	7,46	7,62	0,628	8,25	5,87	0,488	8,32
MRT _{0-inf} (ч)	6,58	0,445	6,76	10,81	0,878	8,12	6,79	0,648	9,54

AUC_{Extra} (%)	1,27	0,0513	4,05	4,86	1,1433	23,51	1,54	0,272	17,7
AUMC_{Extra} (%)	12,5	0,666	5,34	32,7	7,481	22,90	14,9	1,457	9,80

Таблица 4. Фармакокинетические индексы при однократном введении через пероральный зонд (0,2 мг/кг) у крыс-самцов SD

PK параметры	PAO (0,22 мг/кг, п.о.)			F2mPAO (0,17 мг/кг, п.о.)			d5PAO (0,19 мг/кг, п.о.)		
	Сред- нее	SD	CV (%)	Сред- нее	SD	CV (%)	Сред- нее	SD	CV (%)
Кол-во точек, использованных для T_{1/2}	3	--	--	3	--	--	3	--	--
C_{max} (нг/мл)	156	12,5	8,03	356	53,1	14,9	161	10,4	6,48
T_{max} (ч)	8,00	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00	7,33	1,15	15,7
T_{1/2} (ч)	6,87	0,942	13,7	8,99	1,34	15,0	7,19	0,778	10,8
T_{last} (ч)	48,0	--	--	48,0	--	--	48,0	--	--
AUC_{0-last} (нг.ч/мл)	2314	420	18,1	6194	774	12,5	2445	475	19,4
AUC_{0-inf} (нг.ч/мл)	2341	426	18,2	6406	746	11,7	2479	483	19,5
MRT_{0-last} (ч)	12,5	0,611	4,88	14,8	1,31	8,86	12,6	0,777	6,15
MRT_{0-inf} (ч)	13,0	0,751	5,76	16,3	1,68	10,3	13,3	0,902	6,80
AUC_{Extra} (%)	1,16	0,467	40,4	3,37	1,31	38,8	1,35	0,444	32,8
AUMC_{Extra} (%)	5,09	1,99	39,0	12,5	4,49	36,0	5,92	1,80	30,3
Биодоступность (%)^a	28,8	--	--	45,9	--	--	28,1	--	--

Пример 4. Исследование ингибирующего воздействия фторированных соединений на фиброз легких

Фиброз легких (PF) представляет собой хроническое фиброзное заболевание легких, которое может быть вызвано различными причинами, в основном проявляется сухим кашлем и прогрессирующей одышкой, с плохим прогнозом и все

еще трудно поддающееся лечению. Основным патологическим признаком ПФ является чрезмерное рубцевание после разрушения нормальной структуры легких, что в конечном итоге приводит к дыхательной недостаточности. Несмотря на то, что исследования патофизиологических механизмов фиброза легких достигли больших успехов, его патогенез до конца не выяснен.

Клетки эмбриональных фибробластов легких человека MRC-5 являются важным инструментом для исследования патологических изменений ПФ и осуществления разработки лекарственных средств. В процессе развития ПФ родственные транскрипционные факторы, такие как трансформирующий фактор роста-1 (TGF- β 1), могут регулировать аномальную активацию, пролиферацию и миграцию фибробластов, вызывая аномальное отложение внеклеточного матрикса и разрушение альвеолярной структуры, что в конечном итоге приводит к формированию ПФ. TGF- β 1 является одним из ключевых факторов индуцирования ПФ, который может регулировать трансформацию фибробластов в миофибробласты в результате связывания с соответствующим рецептором, поэтому определенную концентрацию TGF- β 1 обычно используют для обработки клеток MRC-5 с целью индуцирования фиброза в экспериментальном процессе.

1. Материалы

Клетки MRC-5 были приобретены в Инновационном центре передового опыта в области молекулярной клеточной науки Китайской академии наук. Человеческий рекомбинантный белок TGF- β 1 был приобретен у компании Proteintech Group (номер по каталогу #HZ-1011). Кроличье первичное антитело к кальпонину1 было приобретено у компании Cell Signaling Technology (номер по каталогу #17819). Кроличье первичное антитело к α -гладкомышечному актину было приобретено у компании Cell Signaling Technology (номер по каталогу #19245). Козье антитело к IgG кролика Alexa Fluor 555 было приобретено у Molecular Probes. Среда DMEM с высоким содержанием сахара, среда MEM и фетальная бычья сыворотка (FBS) были приобретены у Gibco. Инвертированный флуоресцентный микроскоп Olympus FV1000 был приобретен у компании Olympus (Токио, Япония). Флуоресцентная заливочная среда Dako Cytomation была приобретена у компании Dako (Копенгаген, Дания).

2. Методы

2.1 Культивирование клеток MRC-5 и обработка

Клетки MRC-5 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), при постоянной температуре 37°C, 5% CO₂ и насыщенной

влажности в инкубаторе в течение 24 часов, чтобы обеспечить прилипание к стенке в соответствии с рекомендациями по клеточным культурам. На следующий день добавляли среду DMEM (без FBS), содержащую 5 нг/мл TGF- β 1 и F2oPAO, F2mPAO или F3PAO в разных концентрациях согласно распределению по группам, и инкубирование продолжали в течение 24 ч в соответствии с потребностями эксперимента. Распределение по группам было следующее: контрольная группа, группа 5 нг/мл TGF- β 1, группа 5 нг/мл TGF- β 1 и 12,5 нМ F2oPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+12,5 нМ F2oPAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F2oPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+25 нМ F2oPAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F2oPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+50 нМ F2oPAO), группа 5 нг/мл TGF- β 1 и 12,5 нМ F2mPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+12,5 нМ F2mPAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F2mPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+25 нМ F2mPAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F2mPAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+50 нМ F2mPAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 12,5 нМ F3PAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+12,5 нМ F3PAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F3PAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+25 нМ F3PAO), 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F3PAO (группа 5 нг/мл TGF- β 1+50 нМ F3PAO).

2.2 Анализ на жизнеспособность клеток с использованием красителя тиазолилового синего (МТТ)

Клетки обрабатывали лекарственными средствами в течение 24 ч, добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл, и после инкубирования в течение 4 ч инкубационный раствор аспирировали, добавляли 100 мкл DMSO для растворения адсорбированного МТТ, и значение поглощения считывали после встряхивания в течение 15 минут.

2.3 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки MRC-5 обрабатывали в течение 24 часов, надосадочную жидкость аспирировали, клетки промывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (PBS); добавляли 4%-ный параформальдегид (PFA) и оставляли стоять в течение 30 минут при комнатной температуре; 4%-ный PFA удаляли и промывали 3 раза PBS в течение 10 минут каждый раз; добавляли 0,3%-ный неионный детергент Тритон-Х (растворенный в PBS) и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут; 0,3%-ный Тритон-Х удаляли, добавляли блокирующий раствор на основе PBS, содержащий 10%-ную козью сыворотку (GS) и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 часа; первичное антитело инкубировали в течение ночи при 4°C (первичное антитело разбавляли 10%-ным блокирующим раствором GS, соотношение разведения α -гладкомышечного актина 1:200, соотношение разведения кальпониона 1:100). На следующий день клетки 3 раза промывали PBS по 10 мин

каждый раз; козье вторичное антитело к IgG кролика Alexa Fluor 555 (разводили блокирующим раствором в соотношении разведения 1:500 и добавляли 1 мкг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI)) инкубировали и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Клетки промывали PBS 3 раза по 10 мин каждый раз. Срезы запечатывали с использованием заливочной среды и затем наблюдали под микроскопом. Иммунофлуоресцентное окрашивание MSC (мезенхимальных стволовых клеток) костного мозга обрабатывали так же, как описано выше.

2.4 Статистика

Интенсивность флуоресценции определяли с использованием программного обеспечения Image J, обработку данных и статистику выполняли с использованием программы GraphPad Prism5, и данные выражали в виде среднего значения \pm стандартная ошибка (среднее значение \pm SEM). Различия между группами сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, и $p < 0,03$ считали статистическим различием.

3. Результаты

3.1 Ингибирование экспрессии кальпонины 1 и α -гладкомышечного актина серий фторированных соединений в клетках MRC-5, обработанных TGF- β 1

Клетки MRC-5 обрабатывали средой DMEM (без FBS), содержащей 5 нг/мл TGF- β 1, в течение 24 ч и обрабатывали серий фторированных соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам. После обработки клеток MRC-5 5 нг/мл TGF- β 1 в течение 24 ч добавляли F2mPAO, F2oPAO или F3PAO в разных концентрациях согласно распределению по группам, и жизнеспособность клеток определяли анализом с использованием МТТ после инкубирования в течение 4 часов или 24 часов. Результаты показали, что после обработки в течение 4 ч серий фторированных соединений жизнеспособность клеток группы, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1, значительно снизилась по сравнению с контрольной группой (Фиг. 3А), а в других группах отсутствовало значимое изменение жизнеспособности клеток по сравнению с группой, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1; после обработки в течение 24 ч серий фторированных соединений жизнеспособность клеток группы, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1, значительно снизилась по сравнению с контрольной группой (Фиг. 3В); как в группе, обработанной совместно 5 нг/мл TGF- β 1 и 100 нМ F2mPAO, так и в группе, обработанной совместно 5 нг/мл TGF- β 1 и 100 нМ F3PAO, наблюдалось значительное снижение жизнеспособности клеток по сравнению с группой, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1 (Фиг. 3В).

α -Гладкомышечный актин (α -SMA) и актин-связывающий белок кальпонин 1 являются маркерами миофибробластов, и для того, чтобы исследовать, оказывает ли серия

фторированных соединений регуляторное воздействие на фиброз легких, α -SMA и кальпонин 1 определяли после обработки в течение 24 ч серией фторированных соединений соответственно. Результаты экспериментов с иммуноблоттингом белков показали, что экспрессия α -SMA значительно увеличилась в группе, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о том, что обработка клеток MRC-5 5 нг/мл TGF- β 1 в течение 24 ч приводит к клеточному фиброзу, и что 50 нМ F2mPAO, 25 нМ F2oPAO, а также 12,5 нМ, 25 нМ и 50 нМ F3PAO значительно ингибируют 5 нг/мл TGF- β 1-индуцированную сверхэкспрессию α -SMA (Фиг. 4А, С). Результаты экспериментов с иммуноблоттингом белков для кальпонина 1 были аналогичны описанным выше результатам для α -SMA, и экспрессия кальпонина 1 значительно увеличилась в группе, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1, по сравнению с контрольной группой, и F2mPAO, F2oPAO или F3PAO в определенных концентрациях и 5 нг/мл TGF- β 1 показали значительное снижение экспрессии кальпонина 1 по сравнению с группой, обработанной только 5 нг/мл TGF- β 1 (Фиг. 4А, D). Исследование показало, что коллаген типа I (COL1) является одним из важных компонентов внеклеточного матрикса и вовлечен в возникновение и развитие фиброзных процессов в легких. Аналогичным образом также исследовали, оказывает ли серия фторированных соединений регуляторное воздействие на экспрессию COL1 в клетках MRC-5. Результаты показали, что экспрессия коллагена типа I согласуется с результатами для α -SMA и кальпонина 1, описанными выше (Фиг. 4А, В). Кроме того, результаты по иммунофлуоресценции также согласуются с результатами иммуноблоттинга белков, и экспрессия α -SMA была значительно выше в группе, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1, по сравнению с контрольной группой (Фиг. 5А, В). Группы 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F2mPAO, 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F2mPAO, 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F2oPAO, 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F2oPAO, 5 нг/мл TGF- β 1 и 25 нМ F3PAO, а также 5 нг/мл TGF- β 1 и 50 нМ F3PAO не имели существенных различий в интенсивности флуоресцентного сигнала α -SMA по сравнению с контрольной группой, и имели существенное снижение по сравнению с группой, обработанной 5 нг/мл TGF- β 1 (Фиг. 5А, В). Результаты по иммунофлуоресценции актин-связывающего белка кальпонина 1 согласуются с приведенными выше результатами для α -SMA (Фиг. 6А, В). Вышеуказанные результаты показали, что F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в определенной концентрации могут значительно ингибировать TGF- β 1-индуцированный фиброзный процесс в клетках MRC-5.

3.2 Нокдаун (или PI4KA) ингибирует фиброз клеток MRC-5

Серия фторированных соединений представляет собой новые соединения, модифицированные на основе их родительских соединений, хотя предыдущее

исследование показало, что репрезентативное соединение его родительского соединения, PAO, в основном действует на фосфатидилинозитол-4-киназу PI4KIII α при низкой концентрации (<5 мкМ), и для дальнейшего исследования роли соответствующей мишени действия, PI4KIII α , в процессе фиброза был сконструирован лентивирусный вектор кшРНК-интерференции (с последовательностью экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP)) против последовательности гена PI4KA, кодирующего белок PI4KIII α . Результаты экспериментов с иммуноблоттингом белков показали, что после трансфицирования клеток MRC-5 тремя лентивирусными векторами кшРНК-интерференции против PI4KA в течение 48 часов интерференционные последовательности sh1, sh2 и sh3 существенно снижали уровень экспрессии PI4KIII α в группе обработки (Фиг. 7А, В). Экспрессию кальпонины 1 и α -SMA определяли по иммунофлуоресценции после обработки лентивирусными векторами кшРНК-интерференции в течение 48 часов. Уровень экспрессии α -SMA был значительно выше в группе, обработанной совместно sh-ctrl и 5 нг/мл TGF- β 1, по сравнению с группой векторного контроля (sh-ctrl). По сравнению с группой, обработанной совместно sh-ctrl и 5 нг/мл TGF- β 1, уровень экспрессии α -SMA значительно снизился в группе, обработанной sh1 и 5 нг/мл TGF- β 1 и sh3 и 5 нг/мл TGF- β 1, а также наблюдалась тенденция к снижению уровня экспрессии α -SMA в группе, обработанной совместно sh2 и 5 нг/мл TGF- β 1 (Фиг. 8А, С). Полученные результаты для кальпонины 1 согласовывались с результатами для α -SMA (Фиг. 8В, D), что свидетельствует о том, что нокдаун PI4KA ингибирует фиброз клеток MRC-5.

Пример 5. Роль фторированных производных в TGF- β -индуцированной модели фибробластов сердца, печени и почек

1. Фибробласты нормальных желудочков сердца человека (NHCF-V)

Клетки NHCF-V (фибробласты нормальных желудочков сердца человека, при плотности 5000 клеток на лунку, в 2% FBS полной среде, 200 мкл на лунку) высевали в 96-луночные культуральные планшеты (Corning) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 24 часов. В День 1 клетки выдерживали в среде 0,5% FBS-FGM (среда для роста фибробластов с 0,5% FBS) в течение 24 часов. В День 2 в среду для культивирования клеток добавляли лекарственные средства: холостой контроль, нинтеданиб (положительный контроль), F2mPAO, F2oPAO, F3PAO, AsIII (2-меркаптопропил-PAO) и A1 (ингибитор PI4KA, *Naveen Bojjireddy et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 289, NO. 9, pp. 6120-6132, February 28, 2014*). Культуральные среды для всех групп содержали TGF- β (в качестве индуктора фиброза в конечной концентрации 1 нг/мл). Инкубирование продолжали при 37°C/5% CO₂. В День 3 клетки после обработки TGF- β в течение 24 ч промывали холодным DPBS (фосфатно-солевой буферный раствор

Дульбекко) (не содержащий Mg^{2+}/Ca^{2+}). Лизис осуществляли путем добавления 50 мкл раствора для лизиса (0,5 мкл ДНКазы I + 49,5 мкл лизисного лизата) и инкубирования в течение 5 мин при комнатной температуре на горизонтальном шейкере (900 об/мин) с встряхиванием. После добавления 5 мкл стоп-раствора инкубирование продолжали в течение 2 мин. 4 мкл лизата образца добавляли к 16 мкл мастер-микса для обратной транскрипции, хорошо смешивали, и обратную транскрипцию проводили на приборе для ПЦР-анализа. Продукты обратной транскрипции будут использованы для последующей РВ-кПЦР. Мастер-миксы для ПЦР были приготовлены для генов-мишеней (ACTA2, CTGF, PAI-1), а также для гена внутреннего референсного контроля (RPLP0) соответственно. 8 мкл мастер-микса для ПЦР и 2 мкл продукта обратной транскрипции образца тщательно смешивали на планшете центробежного инкубатора (1000 об/мин, 2 мин), и, наконец, ПЦР-реакции проводили на приборе Applied Biosystems™ ViiA7. Каждый образец тестировали в двух повторах. Анализируемыми данными были значения Ct, полученные в экспериментах РВ-ПЦР. Значения Ct, полученные в результате амплификации индивидуальных генов в каждом образце, нормализовали по внутреннему референсному гену RPLP0. Такой же метод обработки данных использовали для следующих экспериментов.

Результаты экспериментов

Добавление TGF- β в раствор для культивирования клеток NHCF-V увеличивало экспрессию мРНК генов, кодирующих α -актинин (ACTA2), фактор роста соединительной ткани (CTGF) и ингибитор активатора пламиногена (PAI-1) (в диапазоне от 130% до 300%, данные не показаны), что свидетельствует о том, что TGF- β индуцирует фиброз в культивированных клетках. Напротив, одновременное добавление в раствор ингибитора рецептора трансформирующего фактора роста β типа I нинтеданиба (положительный контроль) может реверсировать экспрессию мРНК вышеуказанных генов (см. Таблицу 5): экспрессия мРНК трех генов в группе, обработанной нинтеданибом, снижалась на 67%, 61% и 82% соответственно по сравнению с группой, обработанной TGF- β . Аналогично, в группах, обработанных производными PAO F2mPAO, F2oPAO, F3PAO и ASIИ, уровни экспрессии мРНК этих генов ингибировались в разной степени, что свидетельствует о том, что эти соединения могут эффективно ингибировать TGF- β -индуцированный клеточный фиброз. Кроме того, было также известно, что ингибитор PI4KA A1 ингибирует TGF- β -индуцированное повышение экспрессии ACTA2 мРНК, но ингибирование экспрессии CTGF и PAI-1 мРНК свидетельствует о том, что его ингибирующее воздействие не такое сильное, как воздействие производных PAO.

Таблица 5. Воздействие производных PAO на экспрессию мРНК генов в

фибробластах сердца, обработанных TGF-β

Клетка NHCF-V	Относительные изменения уровней мРНК (по сравнению с обработкой TGF-β)		
	ACTA2	CTGF	PAI-1
Тестируемый показатель (100 нМ)			
Нинтеданиб	-67%	-61%	-82%
F2mPAO	-93%	-74%	-17%
F2oPAO	-69%	-51%	-35%
F3PAO	-94%	-72%	-9%
AsIII	-31%	7%	-19%
A1	-81%	7%	116%

2. Звездчатые клетки печени человека (LX-2)

Клетки LX-2 (линия звездчатых клеток печени человека, Sigma-Aldrich SCC064) высевали в 96-луночный планшет при плотности 20000 клеток на лунку (полная среда с 2% FBS, 200 мкл на лунку). В День 1 клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. В День 2 проводили обработку лекарственным средством путем добавления лекарственных средств в среду для культивирования клеток: холостой контроль, нинтеданиб (положительный контроль), F2mPAO, F2oPAO, F3PAO, AsIII, A1 (ингибитор PI4KA). Через 30 минут добавляли TGF-β для индуцирования фиброза, и конечная концентрация TGF-β составляла 5 нг/мл. После обработки TGF-β в течение 24 часов клетки промывали холодным DPBS (без Mg²⁺/Ca²⁺). Лизис осуществляли путем добавления 50 мкл раствора для лизиса (0,5 мкл ДНКазы I + 49,5 мкл лизисного лизата) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре на шейкере (900 об/мин) с встряхиванием. Добавляли 5 мкл стоп-раствора, и инкубирование продолжали в течение 2 мин. 15 мкл образца лизата добавляли к 35 мкл мастер-микса для обратной транскрипции, тщательно смешивали, и затем обратную транскрипцию осуществляли на приборе для ПЦР-анализа, и полученный продукт обратной транскрипции использовали для последующей количественной ПЦР в реальном времени (РВ-кПЦР). Мастер-миксы для ПЦР были приготовлены для генов-мишеней (ACTA2, COL1A1, TGFB1) и гена внутреннего референсного контроля (GAPDH) соответственно. 8 мкл мастер-микса для ПЦР и 2 мкл образца продукта обратной транскрипции тщательно смешивали центрифугированием (1000 об/мин, 2 мин) центрифужном планшете, и, наконец, ПЦР-реакцию проводили на приборе для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems™

QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR. Анализируемыми данными были значения Ct, полученные в экспериментах РВ-кПЦР.

Результаты экспериментов:

Добавление TGF- β в растворы для культивирования клеток LX-2 увеличивало экспрессию мРНК генов, кодирующих α -актинин (ACTA2), цепь α -1 коллагена типа 1 (COL1A) и трансформирующий фактор роста типа 1- β (TGFB1) (в диапазоне от 300% до 400%, данные не показаны), что свидетельствует о том, что TGF- β индуцирует фиброз культивируемых звездчатых гепатоцитов. В то же время раствор, если он также содержал нинтеданиб (400 нМ), то он реверсировал экспрессию мРНК вышеуказанных генов (см. Таблицу 6). В группах, обработанных F2mPAO, F2oPAO и F3PAO, уровни экспрессии мРНК вышеуказанных генов ингибировались в разной степени, что свидетельствует о том, что эти производные PAO могут эффективно ингибировать TGF- β -индуцированный клеточный фиброз, в то время как AsIII не показал очевидного ингибирующего эффекта. A1, ингибитор PI4KA, также ингибировал индуцированное TGF- β увеличение экспрессии мРНК нескольких генов A.

Таблица 6. Воздействие производных PAO на экспрессию мРНК генов в звездчатых гепатоцитах, обработанных TGF- β

Клетка LX-2	Относительные изменения уровней мРНК (по сравнению с обработкой TGF- β)		
	ACTA2	COL1A1	TGFB1
Нинтеданиб (400 нМ)	-55%	-77%	-78%
F2mPAO (100 нМ)	-69%	-54%	-36%
F2oPAO (100 нМ)	21%	-15%	3%
F3PAO (100 нМ)	-65%	-54%	-29%
AsIII (100 нМ)	48%	-3%	7%
A1 (100 нМ)	-92%	-53%	-20%

3. Мезангиальные клетки почки человека (HRMC)

Клетки HRMC (мезангиальные клетки почки человека, при плотности 6000 клеток/лунку, в полной среде с 2%FBS, 100 мкл/лунка) высевали в 96-луночные культуральные планшеты (Corning) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. В День 1 клетки выдерживали в 0,1% FBS в течение 6 часов. В День 2 в среду для культивирования клеток добавляли тестируемые индивидуальные лекарственные средства (F2mPAO, F2oPAO, F3PAO, AsIII и A1; содержащие TGF- β в конечной концентрации 1

нг/мл в 0,1% FBS). Инкубирование продолжали при температуре 37°C и 5% CO₂. В День 3 клетки после обработки TGF-β в течение 24 часов промывали холодным DPBS (без Mg²⁺/Ca²⁺). Лизис осуществляли путем добавления 30 мкл раствора для лизиса (0,3 мкл ДНКазы I + 29,7 мкл лизисного лизата) и инкубирования с встряхиванием при комнатной температуре на шейкере (900 об/мин) в течение 5 минут. Добавляли 3 мкл стоп-раствора, и инкубирование продолжали в течение 2 мин. 6 мкл образца лизата добавляли к 24 мкл мастер-микса для обратной транскрипции, тщательно смешивали, и затем обратную транскрипцию проводили на приборе для ПЦР-анализа, и полученный продукт обратной транскрипции использовали для последующей количественной ПЦР в реальном времени (РВ-кПЦР). Мастер-миксы для ПЦР были приготовлены для генов-мишеней (COL4A1, COL16A1 и CTGF), а также для гена внутреннего референсного контроля (RPLP0) соответственно. Смешивали 8 мкл каждого мастер-микса для ПЦР и 2 мкл продукта обратной транскрипции лизированных образцов, планшеты центрифугировали (1000 об/мин, 2 мин), и затем проводили ПЦР-реакции на приборе Applied Biosystems ViiA7.

Результаты экспериментов:

Добавление TGF-β к культурам клеток HRMC увеличивало экспрессию мРНК генов, кодирующих альфа-1-цепь коллагена типа 16 (COL16A1), альфа-1-цепь коллагена типа 4 (COL4A1α-1) и фактора роста соединительной ткани (CTGF) в клетках (в диапазоне от 200% до 300%, данные не показаны), что свидетельствует о том, что TGF-β может индуцировать фиброз в культивированных мезангиальных клетках почки. И раствор, если он также содержал 100 нМ нинтеданиба, реверсировал экспрессию мРНК вышеуказанных генов (см. Таблицу 7). В группах обработки F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в одинаковой концентрации уровни экспрессии мРНК вышеуказанных генов ингибировались в разной степени, и ингибирование было сильнее, чем ингибирование положительным контролем нинтеданибом, что свидетельствует о том, что эти производные PAO могут эффективно ингибировать TGF-β-индуцированный клеточный фиброз, но ингибирование ASIII было относительно слабым. Ингибитор PI4KA A1 ингибировал только индуцированное TGF-β повышение экспрессии мРНК гена CTGF.

Таблица 7. Воздействие производных PAO на экспрессию мРНК генов в фибробластах печени, обработанных TGF-β

Клетка HRMC	Относительные изменения уровней мРНК (по сравнению с обработкой TGF-β)		
	COL16A1	COL4A1	CTGF
Тестируемый показатель (100 нМ)			

Нинтеданиб	-57%	-55%	-53%
F2mPAO	-63%	-55%	-81%
F2oPAO	-78%	-74%	-70%
F3PAO	-72%	-62%	-83%
ASIII	-28%	-7%	-20%
A1	2%	-2%	-66%

Пример 6. Исследование PAO и его производных в ингибировании фиброза сердца

1. Экстракция первичных фибробластов миокарда:

Изолирование и культивирование первичных фибробластов миокарда: первичные фибробласты миокарда крысы-сосунка C57BL/6J экстрагировали с использованием 0,2% коллагеназы типа 2.

Крыс-сосунков C57BL/6J через 0-3 дня после рождения (самцы, Shanghai Jihui) стерилизовали в 75%-ном этаноле. После изолирования сердец крыс-сосунков кожу и ребра разрезали, и сердца крыс-сосунков изолировали; изолированные сердца помещали в стерилизованный PBS и промывали 3 раза, сердца разрезали ножницами на мелкие кусочки ткани, промывали 3 раза PBS и затем расщепляли 0,025%-ным трипсином (Gibco) при 4°C в течение ночи.

Промытые кусочки ткани повторно расщепляли с использованием 0,2% коллагеназы типа 2 при 37°C в течение 30 минут; их нейтрализовали с использованием среды DMEM (Gibco), содержащей 10% сыворотки, и центрифугировали в течение 5 минут. Надосадочную жидкость осторожно сливали, и осадок промывали средой DMEM, содержащей 10% сыворотки, и высевали в культуральные колбы 25 см² (Corning). Через 2 часа после прикрепления среду заменяли. Клетки наблюдали под микроскопом через 24, 48 и 72 часа на предмет прикрепления к стенкам и роста, и для экспериментов брали 2-3-е поколение клеток.

2. Установление гипоксических условий в культивированных сердечных фибробластах:

Эксперименты были разделены на контрольную группу, группу с 24-часовой аноксией и группу с 24-часовой аноксией + d5PAO или группу воздействия PAO. Первичные фибробласты миокарда распределяли в лунки для клеточной культуры (Corning) в шестилуночных планшетах, и после полного прикрепления к стенкам и слияния до 70%-80% клетки выдерживали в среде без сыворотки в течение 24 часов, затем среду без сыворотки заменяли и добавляли d5PAO/PAO в различных концентрациях, затем

помещали в аноксический бокс (Mitsubishi, Япония) для аноксии, и затем клетки стимулировали в течение 24 часов микротребовательным АнаероPack (использовали АнаероPack фирмы Mitsubishi, Япония). Когда анаэробный индикатор показывал изменение цвета с розового на пурпурный и обратно на розовый, это указывало на успешную аноксию, и клетки собирали для резервного использования.

3. Определение экспрессии гена α -SMA и Col 1A методом флуоресцентной количественной ПЦР:

Общую РНК экстрагировали с использованием набора для экстракции РНК (B0004DP, Suzhou Yingze Biomedical Co., Ltd.), и концентрацию и чистоту РНК определяли с использованием спектрофотометра (Thermo Fisher). кДНК была получена в результате реакции обратной транскрипции 1000 нг общей РНК с использованием набора для обратной транскрипции (Shanghai Yi Sheng). кДНК α -SMA и Col 1A амплифицировали методом флуоресцентной количественной ПЦР с использованием набора SYBR Green (Shanghai Yi Sheng), и ген GAPDH использовали в качестве внутреннего референса. Последовательности кДНК вышеуказанных генов были загружены с веб-сайта NCBI, и ПЦР-праймеры были синтезированы компанией Shanghai Sangong Biological Engineering Co. Последовательности праймеров были следующие:

α -SMA: прямой GTCCCAGACATCAGGGAGTAA, обратный
TCGGATACTTCAGCGTCAGGA;

Col 1A: прямой TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA, обратный
GGGTCCCTCGACTCCTACAT;

GAPDH: прямой CCAGGCGCCCAATACC, обратный CCACATCGCTCAGACACCAT.

4. Определение экспрессии SMA и белка Col 1A методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг) клеточных экстрактов:

Среду аспирировали, и чашки промывали 2 раза PBS. Соответствующее количество буфера для лизиса RIPA (Beyotime), содержащего ингибитор протеазы, добавляли согласно общему количеству культивируемых клеток и подвергали лизису на льду в течение 30 минут. На протяжении этого времени лизат перемешивали на вортексе и встряхивали несколько раз для обеспечения адекватного лизиса белка. Затем лизат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C, и надосадочная жидкость представляла собой полученный общий клеточный белок. Белок количественно определяли с использованием набора BCA (Beyotime). Для электрофореза 30 мкг белка применяли гель набора SDS-PAGE (Epizyme). Первичное антитело использовали в качестве антитела к Col 1A (Abcam), антитела к α -SMA (Abcam); вторичное антитело использовали в качестве HRP (пероксидаза хрена)-меченого антитела (Beyotime), и GAPDH (глицерилальдегид-3-

фосфатдегидрогеназа), тубулин использовали в качестве внутреннего стандарта. Для анализа полос по шкале серых тонов применяли программное обеспечение Image-Pro Plus 6.0.

5. Определение жизнеспособности культивированных фибробластов сердца методом ССК8:

Первое поколение фибробластов миокарда распределяли в 96-луночные планшеты (Corning), и после полного прикрепления клеток к стенкам и слияния до 70%-80% их выдерживали в среде DMEM без сыворотки в течение 24 часов, затем помещали в бокс для аноксии, и клетки стимулировали микротребовательными пакетами для аноксии в течение 24 часов. Когда индикатор аноксии менял цвет с розового на пурпурный, а затем обратно на розовый, тогда это показывало что аноксия была успешной. Затем в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента ССК8 (Beyotime) и 90 мкл среды DMEM, клетки инкубировали при 37°C в течение 2 часов, и затем применяли микропланшет-ридер для определения значения поглощения (OD) при длине волны 450 нм для оценки пролиферации клеток и жизнеспособности клеток. Для каждой группы было отведено по пять повторных лунок.

6. Тест на миграционную способность фибробластов миокарда (скретч-анализ):

Первичные фибробласты миокарда высевали в 6-луночные планшеты с нарисованными параллельными линиями, и когда плотность клеток составляла примерно 80%, после голодания (культуральная среда без сыворотки) в течение 24 часов создавали царапины по ранее нарисованным параллельным линиям стерилизованным концом шприца 200 мкл. Клетки трижды промывали раствором PBS, и открепившиеся клетки аспирировали и отбрасывали. Затем клетки подвергали аноксии и фармакологическим воздействиям, и для каждой группы было отведено по три повторных лунки соответственно. Миграцию клеток в зону царапин наблюдали под инвертированным микроскопом через 0 часов и 24 часа. Программное обеспечение ImageJ использовали для вычисления ширины царапины, занятой мигрировавшими клетками, и зоны царапины для каждого микроскопического поля, и степень миграции вычисляли как процент площади царапины, занятой мигрировавшими клетками, от исходной площади царапины.

7. Конструирование мышинной модели инфаркта:

Использовали взрослых самцы мышей (C57BL/6J Shanghai Jihui) в возрасте 7-8 недель, которые голодали в течение 10 часов до операции. После сбывания шерсти и обнажения кожи мышей анестезировали изофлураном (400 мл/мин), кожу левой стороны грудной клетки (примерно 0,5 см) обрезали, сердце мыши обнажали, и переднюю

нисходящую артерию к проксимальному концу левой коронарной артерии мышей перевязывали неинвазивной нитью № 7,0 для ушивания грудной клетки, и для оценки эффекта операции были сделаны электрокардиограмма и УЗИ сердца.

8. Определение степени фиброза в пери-инфарктной области мышей (окрашивание красителем HE и окрашивание по Массону):

Мышей лечили введением d5PAO/PAO (0,3 мг/кг) через пероральный зонд на следующий день после операции по моделированию инфаркта, и через 2 недели мышей в каждой опытной группе подвергали газовой анестезии с последующей декапитацией, и после перфузии 4%-ного параформальдегида извлекали ткани сердца и продолжали фиксировать в 4%-ном параформальдегиде в течение 48 часов, и затем ткани заключали в парафин, делали срезы и окрашивали их.

Реагенты и приборы

Реагенты: 0,5%-ный спиртовой раствор эозина для окрашивания, модифицированный гематоксилин Харриса, 0,5%-ный спиртовой раствор соляной кислоты.

1.1 Эозин: способ приготовления: нейтральный красный 0,5 г, 80%-ный спирт 100 мл, эозин (Sigma) растворяли в спирте и перемешивали до полного растворения для дальнейшего использования.

1.2 Гематоксилин: приготовление: жидкость А: гематоксилин (Sigma) 1 г, безводный спирт (Sinopharm) 10 мл; жидкость В: сульфат калия и алюминия (Sinopharm) 20 г, 200 мл дистиллированной воды; две жидкости растворяли и смешивали, нагревали до кипения и затем медленно добавляли красный оксид ртути 0,5 г, в это время образуется большое количество пузырьков, поэтому контейнер должен быть большим, чтобы жидкость не переливалась, и затем окрашивающий раствор быстро охлаждали, фильтровали, и к 100 мл раствора добавляли 6 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл глицерина.

1.3 Способ приготовления 0,7%-ного спиртового раствора соляной кислоты: соляная кислота 0,7 мл, 70%-ный спирт 100 мл.

Название реагента	Производитель	Номер по каталогу	Место происхождения
Кислый фуксин	Sinopharm	71019360	Китай
Понсо (Ponceaux)	Sinopharm	71033761	Китай
Соляная кислота	Sinopharm	10011018	Китай
Безводный этанол	Sinopharm	10009218	Китай
Анилиновый синий	Sinopharm	71003644	Китай

Фосфомолибденовая кислота	ОКА	XW514297441	Китай
Ледяная уксусная кислота	Sinopharm	10000208	Китай

Приборы

Полуавтоматический дегидратор, производитель: Leica; модель: TP1020;

полностью автоматическая машина для заключения в парафин, производитель: Leica, модель: EG1150;

полностью автоматическая машина для резки парафина, производитель: Leica, модель: RM2235;

электронный микроскоп Nikon H500S с программным обеспечением для обработки микрографических изображений Nikon;

программное обеспечение для анализа изображений NIS-Element;

микроскоп: Nikon Eclipse 50i, модель: H550S;

цифровой фотоаппарат: Nikon, модель: DS-Fi1;

профессиональное программное обеспечение для анализа изображений Image pro plus 6.0.

Экспериментальные методы

Окрашивание HE (гематоксилином) парафиновых срезов

1) Поместить парафиновые срезы размером 4 мкм в термостат при 60°C на 1-2 часа и удалить парафин с использованием обычного ксилола, этанола;

2) окрашивать гематоксилином (Sigma) в течение 10 минут, промыть проточной водой для удаления остатков красителя;

3) дифференцировать этанолом с 0,7% соляной кислоты (Sinopharm) в течение нескольких секунд, промыть проточной водой;

4) дать возможность срезам посинеть в течение примерно 15 минут и замочить в 7,95%-ном этаноле на 30 секунд;

5) окрашивать спиртовым эозином (Sigma) в течение 30 секунд;

6) фиксировать 95%-ным этанолом в течение 30+30 секунд, затем 100%-ным этанолом (Sinopharm) в течение 30+30 секунд;

7) обработать ксилолом-карболовой кислотой (1:4 карболовая кислота 1-ксилол 4) в течение 30 секунд;

8) обработать ксилолом в течение 30 секунд + 30 секунд;

9) окончательная герметизация нейтральной смолой.

Окрашивание по Массону

1) Поместить парафиновые срезы в термостат при 60°C на 1-2 часа;

- 2) депарафинировать срезы обычным ксилолом, этанолом-водой;
- 3) окрашивать железным гематоксилином Вейгерта (Weigert) (смесь жидкости Weigert A и жидкости Weigert B в равных объемах) в течение 10 минут, слегка промыть проточной водой;
- 4) дифференцировать спиртом с 1% соляной кислоты, промывать проточной водой в течение нескольких минут;
- 5) окрашивать раствором кислотного красного - Li Chun красного в течение примерно 5-10 минут (рекомендуется попробовать окрасить срез, чтобы найти лучшее время окрашивания), слегка промыть проточной водой;
- 6) слегка промыть 0,2%-ной уксусной кислотой;
- 7) дифференцировать и окрашивать раствором фосфомолибденовой кислоты в течение 3-5 минут, пока под микроскопом не станет видна дифференциация ткани по разным степеням красного цвета;
- 8) слегка промыть 0,2%-ной уксусной кислотой;
- 9) окрашивать раствором анилинового синего в течение 1-5 минут;
- 10) слегка промыть 0,2%-ной уксусной кислотой, слегка промыть 95%-ным спиртом;
- 11) дегидратировать безводным спиртом, ксилоловая прозрачность, заделать срез в нейтральную смолу, исследовать под микроскопом.

9. Определение экспрессии белка SMA и Col 1A методом иммуноблоттинга (WB) экстрактов тканей животных

Мышей с инфарктом миокарда лечили путем введения через пероральный зонд d5PAO/PAO (0,3 мг/кг) на следующий день после создания инфаркта, и через 2 недели мышей в каждой экспериментальной группе декапитировали под газовой анестезией, и после перфузии 4%-ного параформальдегида извлекали ткани сердца и затем продолжали фиксировать 4%-ным параформальдегидом в течение 48 часов. Затем ткани заливали парафином, делали срезы и окрашивали их. Для сравнения были взяты инфарктный участок модельной группы и инфарктный участок группы интервенции: ткани разрезали на кусочки и подвергали лизису путем добавления соответствующего количества реагента для лизиса RIPA (Beyotime), содержащего ингибиторы протеазы и фосфатазы (Beyotime), и одновременно ткани перемешивали на вортексе и встряхивали несколько раз для обеспечения адекватного расщепления белка. Затем лизаты центрифугировали при концентрации 12000 g в течение 15 мин при 4°C, и надосадочная жидкость представляла собой полученный общий клеточный белок. Белок количественно определяли с использованием набора BCA (Beyotime). Для электрофореза 30 мкг белка применяли гель

набора SDSPAGE (Epizyme). Антитело к Col 1A (Abcam) и антитело к α -SMA (Abcam) использовали в качестве первичных антител, HRP-меченое антитело (Beyotime) использовали в качестве вторичного антитела, и GAPDH и тубулин использовали в качестве внутреннего стандарта. Для анализа полос по шкале серых тонов применяли программное обеспечение Image-Pro Plus 6.0.

10. Статистическая обработка

Для статистического анализа использовали программное обеспечение SPSS22.0. Данные измерений выражали в виде $x \pm s$, и для сравнения между двумя группами использовали критерий Стьюдента независимых выборок; данные подсчетов выражали в виде показателя (%), и для сравнения между группами использовали критерий χ^2 . $p < 0,05$ считали статистически значимым различием.

11. Результаты

означает по сравнению с контролем, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$. * означает по сравнению с моделью, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Воздействие d5PAO и PAO на культивируемые фибробласты миокарда

11.1 d5PAO и PAO ингибируют стимулированный аноксией рост культивируемых фибробластов миокарда (анализ ССК8)

Результаты показали (Фиг. 9), что пролиферационная способность фибробластов миокарда значительно повышается в условиях 24-часового инкубирования в условиях аноксии по сравнению с контрольной группой, от $100\% \pm 5,0\%$ в контрольной группе до примерно $137\% \pm 5,3\%$ в гипоксической группе (### $p < 0,0001$), что свидетельствует о том, что гипоксические условия стимулируют пролиферацию и миграцию фибробластов (а также доказывают успешность модели фибробластов). Добавление d5PAO/PAO в разных концентрациях в гипоксических условиях, соответственно, выявило, что пролиферационная и миграционная способность фибробластов также снижается, и когда концентрация d5PAO/PAO достигает 100 нМ, она имеет статистически значимое отличие от гипоксической группы (100 нМ/л, ### $p < 0,0001$). PAO/d5PAO в концентрации ниже 100 нМ существенно не изменяли жизнеспособность клеток. Подобно PAO, d5PAO при 100 нМ также может ингибировать индуцированную аноксией пролиферацию и миграцию фибробластов ($97,5\% \pm 3,9\%$, ##### $p < 0,0001$ по сравнению с гипоксической группой). Эксперименты показали, что и PAO, и d5PAO могут эффективно ингибировать стимулированный аноксией рост культивируемых фибробластов миокарда.

11.2 PAO ингибирует стимулированную аноксией клеточную экспрессию гена SMA/Col 1A (количественная ПЦР, к-ПЦР)

SMA и коллаген-1 являются типичными белками-маркерами клеточного фиброза.

к-ПЦР (Фиг. 10) выявила, что экспрессия гена SMA существенно увеличивается в условиях аноксии в течение 24 ч (увеличение со $100\% \pm 0,9\%$ до $202\% \pm 10,2\%$, $P < 0,0001$), тогда как PAO (25, 50, 100 нМ) может ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который представляет собой дозозависимый ингибирующий эффект: чем выше концентрация PAO, тем значительнее ингибирующий эффект (экспрессия SMA составляет $157\% \pm 6,9\%$, $P < 0,05$; $144\% \pm 5,5\%$, $P < 0,001$; и $131\% \pm 8,5\%$, $P < 0,001$ соответственно).

Экспрессия гена Col 1A, кодирующего коллаген-1, также существенно увеличивалась в условиях аноксии в течение 24 ч (увеличение со $100\% \pm 0,6\%$ до $234\% \pm 9,8\%$), тогда как PAO (50, 100 нМ) ингибирует этот усиливающий экспрессию эффект, который представляет собой дозозависимый ингибирующий эффект: чем выше концентрация PAO, тем значительнее ингибирующий эффект (экспрессия Col 1A составляет $171\% \pm 12,5\%$, $P < 0,05$, и $163\% \pm 12\%$, $P < 0,05$ соответственно).

11.3 PAO ингибирует индуцированную аноксией экспрессию клеточного белка коллагена-1 и SMA (WB)

Результаты WB (Фиг. 11) показали, что экспрессия белка коллагена-1 в кардиомиоцитах существенно увеличивается в условиях аноксии в течение 24 часов (увеличение со $100\% \pm 0,6\%$ до $144\% \pm 7,0\%$, $P < 0,005$), тогда как PAO (12,5, 25, 50, 100 нМ) может ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который представляет собой дозозависимый ингибирующий эффект: чем выше концентрация PAO, тем значительнее ингибирующий эффект, и экспрессия коллагена-1 составляет $118\% \pm 3,2\%$, $P < 0,05$; $114\% \pm 4,8\%$, $P < 0,05$; $112\% \pm 4,0\%$, $P < 0,05$; и $105\% \pm 3,0\%$, $P < 0,001$ соответственно.

Экспрессия белка SMA также существенно увеличивалась в условиях аноксии в течение 24 ч (увеличение со $100\% \pm 0,6\%$ до $131\% \pm 7,0\%$, $P < 0,05\%$), тогда как PAO (20, 50, 100 нМ) может ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который представляет собой дозозависимый ингибирующий эффект: чем выше концентрация PAO, тем значительнее ингибирующий эффект (экспрессия SMA составляет $125\% \pm 6,4\%$, $P < 0,05$, $117\% \pm 4,6\%$, $P < 0,001$, $109\% \pm 8,7\%$, $P < 0,001$ соответственно).

A1 и G1 ингибируют индуцированную аноксией экспрессию клеточного белка коллагена-1 и SMA (WB)

Результаты WB (Фиг. 12) показали, что экспрессия белка коллагена-1 в кардиомиоцитах значительно увеличивалась в условиях аноксии в течение 24 часов (увеличение со $100\% \pm 0,6\%$ до $125\% \pm 3,2\%$, $P < 0,005$), в то же время известные ингибиторы PI4KIII α A1 и G1 (100 нМ/л) могут ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект. Экспрессия коллагена-1 составила $104\% \pm 2,1\%$, $P < 0,001$, и $83\% \pm 2,0\%$, $P < 0,0001$ соответственно.

Экспрессия белка SMA также существенно увеличивалась в условиях аноксии в течение 24 ч (увеличение со $100\% \pm 0,3\%$ до $127\% \pm 3,4\%$, $P < 0,05\%$), в то же время A1 и G1 (100 нМ/л) могут ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект (экспрессия SMA составила $41\% \pm 4,6\%$, $P < 0,0001$ и $55\% \pm 8,7\%$, $P < 0,0001$ соответственно). Рассматривая A1 и G1 в качестве ингибиторов PI4KIII α , результаты WB подтвердили, что PI4KIII α по всей вероятности тесно связан с фиброзом, и ингибирование PI4KIII α или PI4KA может оказывать положительное действие на фиброз.

11.4 РАО ингибирует индуцированное аноксией усиление миграции фибробластов миокарда (скретч-анализ)

Скретч-эксперименты показали (Фиг. 13), что миграционная способность клеток существенно увеличивается в условиях аноксии в течение 24 часов со $100\% \pm 0,6\%$ до $140\% \pm 7,9\%$ в контрольной группе ($P < 0,001$). Напротив, РАО (100 нМ) эффективно ингибирует увеличение миграционной способности ($113\% \pm 2,6\%$, $P < 0,05$). d5PAO обладает аналогичной функцией и эффективно ингибирует индуцированное аноксией увеличение миграционной способности в концентрации 100 нМ ($113\% \pm 3,8\%$, $P < 0,05$). % Миграции = (исходная площадь царапины - площадь царапины через 24 часа)/исходная площадь царапины $\times 100\%$.

11.5 Эффективность d5PAO и РАО в мышинной модели инфаркта миокарда

1) РАО эффективно ингибирует усиление экспрессии белка SMA и коллагена-1 в зоне инфаркта

Результаты WB (Фиг. 14) показали, что экспрессия белков SMA и коллагена-1 в тканях сердца в мышинной модели инфаркта была значительно выше, чем в контрольной группе, увеличившись по сравнению с контрольной группой со $100\% \pm 0,6\%$ до $180\% \pm 11,2\%$ ($P < 0,001$), $162\% \pm 9,2\%$ ($P < 0,001$). Напротив, РАО (пероральный зонд, 0,3 мг/кг) значительно ингибировал увеличение уровней обоих белков со снижением уровня SMA до $138\% \pm 6,7\%$ ($P < 0,05$) и снижением уровня коллагена до $128\% \pm 5,2\%$ ($P < 0,05$).

2) РАО эффективно ингибирует увеличение площади фиброза, содержащей коллаген, в зоне инфаркта

Сердца мышей в группе инфаркта (MI) демонстрировали явную травму, и иммуногистохимическое окрашивание показало, что площадь фиброза сердец мышей в группе инфаркта значительно увеличилась ($46,13\% \pm 2,0\%$, $P < 0,0001$), тогда как РАО (пероральный зонд, 0,3 мг/кг) в определенной степени сокращал площадь фиброза, уменьшив ее до $32,9\% \pm 1,3\%$ ($P < 0,001$). С другой стороны, окрашивание по Массону показало (Фиг. 15), что содержащая коллаген область в тканях сердец мышей в группе инфаркта также значительно увеличилась ($45,47\% \pm 1,7\%$, $P < 0,0001$), и, аналогично, РАО

вызывает уменьшение содержащей коллаген области до $31,30\% \pm 1,48\%$ ($P < 0,001$).

Заключение:

Приведенные выше результаты показали, что PAO и d5PAO ингибируют индуцированную аноксией пролиферацию фибробластов миокарда, культивированных *in vitro*. PAO также ингибирует индуцированное стимуляцией аноксией увеличение экспрессии белков SMA и коллагена-1, являющихся маркерами клеточного фиброза, и их кодирующих генов, SMA и Col 1A, а также способность кардиомиоцитов мигрировать после повреждения. A1 и G1, известные ингибиторы PI4KIII α или PI4KA, также ингибируют индуцированное аноксией увеличение уровней белков SMA и коллагена-1. Эксперименты *in vivo* показали, что PAO также эффективен в ингибировании усиления экспрессии белков SMA и коллагена-1 в зоне инфаркта, а также увеличения содержащей коллаген области фиброза в зоне инфаркта. Эти результаты подтвердили, что PAO и d5PAO эффективны в предупреждении фиброгенеза сердца после аноксии и, таким образом, являются потенциальными терапевтическими агентами для родственных заболеваний.

Пример 7. Сравнение эффективности серии фторированных соединений в отношении α -синуклеина и A β 42

1. Экспериментальные материалы

1.1 Реагенты и расходные материалы

Набор для ELISA α -синуклеина был приобретен у компании Thermo Fisher Scientific (номер по каталогу KHB0061).

Набор для ELISA амилоида бета 42 человека был приобретен у компании Thermo Fisher Scientific (номер по каталогу KHB3544).

Реагент для трансфекции Fugene HD был приобретен у компании Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (номер по каталогу E2311).

Моноклональное антитело к α -синуклеину (мышинное моноклональное) было приобретено у компании Sigma-Aldrich (Shanghai, номер по каталогу S5566).

1.2 Приборы

Инверсный микроскоп Olympus IX51, лазерный конфокальный микроскоп FV1000 были приобретены у Olympus (Япония); микропланшет-ридер NovoStar был приобретен у компании BMG (Германия).

1.3 Информация о плазмиде

Плазмида была приобретена у компании Obio Technology (Shanghai) Corp, Ltd.

Информация о плазмиде для сверхэкспрессии α -синуклеина следующая:

Последовательность:

ATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGC
 TGAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGT
 CTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGC
 TGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTG
 ACAGCAGTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTG
 GCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGG
 AATTCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGA
 GGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAA

Векторная карта представлена на Фиг. 16.

2. Экспериментальные методы

2.1 Культура клеток и обработка лекарственным средством:

Полная культуральная система для клеток SH-SY5Y представляла собой DMEM с высоким содержанием сахара с 15% FBS. Плазмиды трансфицировали с использованием реагента для трансфекции Fugene HD, и клетки инкубировали в течение 24 часов и затем подвергали голоданию, т.е. удаляли сыворотку и использовали только среду DMEM с высоким содержанием сахара. После инкубирования в течение 24 часов культуральную среду заменяли на полную культуральную систему, и культуру обрабатывали лекарственными средствами.

Стабильная клеточная линия trans APP (SW) HEK293 (предоставленная группой Haiyan Zhang, Шанхайский институт фармацевтических наук, Китайская академия наук) представляет собой линию клеток эмбриона почки человека, трансфицированную кДНК, кодирующей содержащий шведскую двойную мутацию APP695, и перед засеиванием планшетов их необходимо обработать 20 мкг/мл поли-D-лизина (PDL) в течение 24 часов. Культуральная среда представляла собой DMEM с высоким содержанием сахара с 10% FBS, и скрининг осуществляли с использованием 200 мкг/мл G418 в то же время. Засеянные планшеты инкубировали в течение 48 ч и затем подвергали голоданию, т.е. сыворотку удаляли и использовали только среду DMEM с высоким содержанием сахара. После инкубирования в течение 24 ч культуральную среду заменяли на полную культуральную систему, и культуру обрабатывали лекарственными средствами.

2.2 Определение жизнеспособности клеток анализом с использованием тиазолилового синего (МТТ)

После обработки в течение 12 часов лекарственным средством добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали в течение 4 часов, и затем инкубационный раствор аспирировали, добавляли 100 мкл DMSO для растворения адсорбированного МТТ, и значение поглощения регистрировали после встряхивания в

течение 15 минут.

2.3 Анализ ELISA

а) ELISA-анализ α -синуклеина

50 мкл раствора антитела для детектирования α -синуклеина человека добавляли в каждую лунку (за исключением хромогенных холостых контролей), затем 50 мкл образца и стандартов (см. Фиг. 17 для стандартного приготовления) добавляли в каждую лунку (за исключением хромогенных холостых контролей); все лунки слегка встряхивали для смешивания и инкубировали при 4°C в течение ночи накрытыми мембраной. Каждую лунку промывали четыре раза 100 мкл буфера 1X Wash; в каждую лунку, за исключением холостых колориметрических лунок, добавляли 100 мкл Anti-Rabbit IgG HRP и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре накрытыми мембраной, и затем четыре раза промывали буфером 1X Wash. В каждую лунку добавляли 100 мкл стабилизированного хромогена, раствор становился синим, и каждую лунку инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре вдали от света. В каждую лунку добавляли по 100 мкл стоп-раствора и смешивали, слегка встряхивая; раствор становился желтым; и значение поглощения регистрировали сразу на микропланшет-ридере (длина волны поглощения 450 нм).

б) ELISA-анализ A β

По 100 мкл разведенного стандарта, холостого контроля и образца вносили в соответствующие лунки планшета для анализа; лунки инкубировали при 37°C в течение 2 часов накрытыми мембраной; жидкость из каждой лунки удаляли и отбрасывали, и в каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора реагента для детектирования A и инкубировали при 37°C в течение 1 часа накрытыми мембраной. Надосадочную жидкость отбрасывали, и каждую лунку промывали буфером 1X Wash 3 раза в течение 2 минут каждый раз и оставляли как можно меньше жидкости. В каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора реагента для детектирования B и инкубировали при 37°C в течение 1 ч накрытыми мембраной; операцию промывки повторяли 5 раз. В каждую лунку добавляли 90 мкл раствора субстрата и инкубировали при 37°C в течение 20 минут вдали от света накрытыми мембраной. Раствор становился синим; в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора и смешивали, слегка встряхивая; раствор становился желтым; и значение поглощения регистрировали с использованием микропланшет-ридера (длина волны поглощения 450 нм) как можно скорее.

2.4 Статистический анализ

Обработку данных анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Обработку выполняли с использованием однофакторного ANOVA,

среднее значение \pm SEM, $p < 0,03$ статистическое различие.

3. Результаты

3.1 Воздействие серии фторированных соединений на жизнеспособность клеток SH-sy5y и α -синуклеин

Клетки SH-SY5Y обрабатывали DMEM с высоким содержанием сахара с 15% FBS, трансфицировали холостой (носитель) плазмидой или плазмидой сверхэкспрессии α -синуклеина с использованием реагента для трансфекции Fugene HD и инкубировали в течение 24 ч, затем подвергали голоданию, т.е. удаляли сыворотку и использовали только среду DMEM с высоким содержанием сахара для инкубирования в течение 24 часов. Согласно распределению по группам клетки соответственно обрабатывали F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в разных концентрациях. Жизнеспособность клеток определяли с использованием МТТ-анализа через 4 ч и 24 ч после обработки серией фторированных соединений соответственно. Результаты эксперимента показали, что жизнеспособность клеток в каждой группе не претерпела существенных изменений по сравнению с группой α -syn OE (группа сверхэкспрессии α -синуклеина) после обработки в течение 4 часов серией фторированных соединений (Фиг. 18А); жизнеспособность клеток в группах, обработанных 100 нМ F2oPAO и 100 нМ F3PAO, значительно снизилась по сравнению с группой α -syn OE после обработки в течение 24 часов серией фторированных соединений (Фиг. 18В).

Надосадочную жидкость клеточных культур собирали после обработки в течение 4 ч разными концентрациями F2mPAO, F2oPAO или F3PAO, и содержание α -синуклеина в клеточной культуральной среде определяли методом ELISA. Результаты показали, что содержание α -синуклеина было значительно выше в надосадочных жидкостях клеточных культур в группе, обработанной совместно α -syn OE и 25 нМ F2mPAO, в группе, обработанной совместно α -syn OE и 50 нМ F2mPAO, и в группе, обработанной совместно α -syn OE и 25 нМ F2oPAO, по сравнению с группой сверхэкспрессии α -синуклеина (α -syn OE) (Фиг. 18С-Д)

3.2 Воздействие серии фторированных соединений на жизнеспособность клеток HEK293 со стабильной трансфекцией APP (SW) и высвобождение A β

Линия клеток HEK293 со стабильной трансфекцией APP (SW) (подарок от группы Haiyan Zhang из Шанхайского института фармацевтических наук Китайской академии наук) представляет собой линию клеток эмбриональной почки человека, трансфицированную кДНК, кодирующей содержащий шведскую двойную мутацию белок-предшественник амилоида (APP) 695, и несущую скрининговую метку G418. Перед высеванием луночные планшеты обрабатывали 20 мкг/мл поли-D-лизина

(PDL) в течение 24 часов. Культуральная среда представляла собой DMEM с высоким содержанием сахара с 10% FBS, и одновременно проводили скрининг с использованием 200 мкг/мл G418. После культивирования в течение 48 часов добавляли фторированные соединения в разных концентрациях, и обработку проводили в течение 4 или 24 часов соответственно; жизнеспособность клеток из разных групп определяли методом МТТ-анализа. Результаты показали, что обработка линии клеток НЕК293 F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в определенных концентрациях в течение 4 ч и 24 ч не оказывала существенного воздействия на жизнеспособность клеток (Фиг. 19А-В).

В эксперименте выявляли воздействие серии фторированных соединений на высвобождение А β (амилоид-бета) из клеток НЕК293, стабильно трансфицированных APP(SW). Клетки культивировали в течение 48 ч и подвергали голоданию в течение 24 ч, затем культуральную среду заменяли полной культуральной системой, и культуру обрабатывали соединениями в течение 4 ч. Уровни А β в надосадочной жидкости цитозоля культуры определяли методом ELISA. Результаты показали, что концентрация А β значительно увеличивается в клеточных надосадочных жидкостях групп, обработанных 50 нМ и 75 нМ F3PAO, по сравнению с контрольной группой (Фиг. 19С-Д).

Пример 8. Воздействие серии фторированных соединений на белок гентингтоновского тракта (НТТ) и супероксиддисмутазу 1 (SOD1)

1. Экспериментальный материал

1.1 Реагенты и расходные материалы

Набор для определения человеческой супероксиддисмутазы 1 (Human Superoxide Dismutase 1 Kit) был приобретен у компании Signalway Antibody LLC. (SAB, номер по каталогу EK16688).

Набор для ELISA гентингтина человека (Human Huntingtin (НТТ) ELISA Kit) был приобретен у компании Signalway Antibody LLC. (SAB, номер по каталогу EK2869).

Реагент для трансфекции Fugene HD был приобретен у компании Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (номер по каталогу E2311).

Реагент для трансфекции Fugene HD был приобретен у компании Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd. (номер по каталогу E2311).

1.2 Приборы

Микропланшет-ридер NovoStar был приобретен у компании BMG (Germany);

1.3 Информация о плаزمидах

Следующие плазмиды были приобретены у компании Obio Technology (Shanghai)

Corp., Ltd.:

1) Название гена: НТТ(1-586aa); GenBank ID:NM_002111; пустая векторная карта и полная карта представлены на Фиг. 20 и Фиг. 21;

2) Название гена: SOD1, ID гена: 6647; пустая векторная карта и полная карта представлены на Фиг. 22 и Фиг. 23.

2. Методы

2.1 Культура клеток и обработка лекарственным средством:

Полная культуральная система для SH-SY5Y представляла собой DMEM с высоким содержанием сахара с 15% FBS. Клетки трансфицировали плазмидами с использованием реагента для трансфекции Fugene HD и инкубировали в течение 24 ч, затем подвергали голоданию, т.е. удаляли сыворотку и использовали только среду DMEM с высоким содержанием сахара. После инкубирования в течение 24 часов культуральную среду заменяли на полную культуральную систему и обрабатывали лекарственными средствами.

2.2 Определение жизнеспособности клеток методом анализа с использованием тиазолилового синего (МТТ)

После обработки лекарственными средствами в течение 12 ч в систему добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов, после чего культуральный раствор аспирировали; в систему добавляли 100 мкл DMSO для растворения адсорбированного МТТ, и значение поглощения регистрировали после встряхивания в течение 15 минут.

2.3 Анализ ELISA

а) ELISA-анализ SOD1

В лунки планшета для анализа вносили по 100 мкл разведенных стандартов, холостого контроля и образцов. Накрывали мембраной, и клетки инкубировали при 37°C в течение 2 ч, жидкость из каждой лунки удаляли, в каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора реагента А для детектирования, накрывали мембраной, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Надосадочную жидкость отбрасывали, и лунки промывали буфером 1X Wash 3 раза в течение 2 мин каждый раз и оставляли как можно меньше жидкости. В каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора реагента для детектирования В и инкубировали в течение 1 часа накрытыми мембраной; операцию промывки повторяли 5 раз. В каждую лунку добавляли 90 мкл раствора субстрата и инкубировали при 37°C в течение 20 минут вдали от света накрытыми мембраной; раствор становился синим. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора, смешивали, слегка встряхивая; раствор становился желтым; и значение поглощения регистрировали как можно скорее с использованием микропланшет-ридера (длина волны поглощения 450 нм).

b) ELISA-анализ гентингина человека

В соответствующие лунки планшета для анализа вносили 50 мкл разбавленного стандарта, 50 мкл холостого контроля и 50 мкл образца. В каждую лунку сразу же добавляли 50 мкл рабочего раствора реагента А для детектирования, смешивали, слегка встряхивая, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч накрытыми мембраной. Надосадочную жидкость отбрасывали; каждую лунку промывали три раза буфером 1X Wash в течение 2 минут каждый раз и оставляли как можно меньше жидкости. В каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора реагента для детектирования В и инкубировали при 37°C в течение 45 минут накрытыми мембраной; операцию промывки повторяли 5 раз. В каждую лунку добавляли 90 мкл раствора субстрата и инкубировали при 37°C в течение 10-20 минут вдали от света накрытыми мембраной. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора, смешивали, слегка встряхивая; раствор становился желтым; и значение поглощения регистрировали сразу на микропланшет-ридере (длина волны поглощения 450 нм).

2.4 Статистический анализ

Обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Обработку выполняли с использованием однофакторного ANOVA, среднее значение \pm SEM, $p < 0,03$ статистическое различие.

3. Результаты

3.1 Серия фторированных соединений промотируют секрецию гентингинового белка (НТТ)

Линию клеток SH-SY5Y культивировали в полной среде (15% FBS, растворенный в DMEM с высоким содержанием сахара) и трансфицировали плазмидой для сверхэкспрессии НТТ (НТТ-ОЕ) в течение 24 часов, подвергали голоданию (DMEM с высоким содержанием сахара) в течение 24 часов и затем обрабатывали серией фторированных соединений в течение 24 часов. Жизнеспособность клеток каждой группы определяли методом анализа с использованием МТТ и по сравнению с группой НТТ-ОЕ методом однофакторного анализа ANOVA. Результаты показали, что жизнеспособность клеток группы НТТ-ОЕ значительно ниже, чем жизнеспособность контрольной группы (Фиг. 24А), и что отсутствует существенное изменение жизнеспособности клеток между группами, обработанными серией фторированных соединений, и группой НТТ-ОЕ.

Линию клеток SH-SY5Y трансфицировали плазмидой для сверхэкспрессии НТТ с использованием Fugene HD и культивировали в течение 24 ч. После обработки голоданием в течение 24 ч клетки обрабатывали соединениями в течение 4 ч согласно распределению по группам, и уровень НТТ в надосадочной жидкости клеточного культурального раствора

определяли методом ELISA. Результаты показали, что концентрация белка НТТ в клеточной культуральной среде группы НТТ-ОЕ значительно выше, чем в контрольной группе; уровень белка НТТ в клеточной культуральной среде в группе, совместно обработанной НТТ-ОЕ и 25 нМ F3PAO, значительно увеличилась по сравнению с группой НТТ-ОЕ, и группы другой обработки также продемонстрировали тенденцию к промотированию секреции НТТ (Фиг. 24В). Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что серия фторированных соединений в определенной концентрации могут промотировать секрецию белка НТТ.

3.2 Серия фторированных соединений промотируют секрецию супероксиддисмутазы 1 (SOD1)

Линию клеток SH-SY5Y культивировали в полной среде (15% FBS, растворенный в DMEM с высоким содержанием сахара) и трансфицировали плазмидой для сверхэкспрессии SOD1 (SOD1-ОЕ) в течение 24 часов, подвергали голоданию (DMEM с высоким содержанием сахара) в течение 24 часов и затем обрабатывали серией фторированных соединений в течение 24 часов. Жизнеспособность клеток каждой группы определяли с использованием МТТ-анализа и по сравнению с группой SOD1-ОЕ с использованием однофакторного анализа ANOVA. Результаты показали, что жизнеспособность клеток группы SOD1-ОЕ была значительно ниже, чем жизнеспособность контрольной (ctrl) группы (Фиг. 25А), и что отсутствуют существенные изменения жизнеспособности клеток между группами, обработанными серией фторированных соединений, и группой НТТ-ОЕ.

Линию клеток SH-SY5Y трансфицировали плазмидой для сверхэкспрессии SOD1 с использованием Fugene HD и культивировали в течение 24 ч. После обработки голоданием в течение 24 ч клетки обрабатывали соединениями в течение 4 ч согласно распределению по группам. Уровень SOD1 в надосадочной жидкости клеточного культурального раствора определяли методом ELISA. Результаты показали, что уровень белка НТТ в клеточной культуральной среде значительно увеличился в группе SOD1-ОЕ по сравнению с контрольной группой; группы, обработанные серией фторированных соединений, продемонстрировали тенденцию к промотированию секреции SOD1 по сравнению с группой SOD1-ОЕ (Фиг. 25В).

Пример 9. Терапевтическое воздействие серии фторированных соединений на болезнь Гоше

1. Клеточная культура

Полная культуральная система для SH-sy5y представляла собой DMEM с высоким содержанием сахара с 15% FBS. Клетки SH-SY5Y обрабатывали 100 мкМ СВЕ в течение

24 ч, затем обрабатывали совместно голоданием (DMEM с высоким содержанием сахара без FBS) и 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч, и затем клетки обрабатывали фторированными соединениями в разных концентрациях в течение 24 ч.

2. Определение жизнеспособности клеток анализом с использованием тиазолилового синего (МТТ)

После обработки в течение 24 часов лекарственным средством в систему добавляли МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 4 часов, после чего культуральный раствор аспирировали, в систему добавляли 100 мкл DMSO для растворения адсорбированного МТТ, и значение поглощения регистрировали после встряхивания в течение 15 минут.

3. Окрашивание с использованием Lyso-tracker

Клетки SH-SY5Y обрабатывали 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч, совместно обрабатывали голоданием (DMEM с высоким содержанием сахара без FBS) и 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч, затем обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях в течение 24 ч и затем обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях еще в течение еще 24 ч. Систему обрабатывали лизосомным трекером Lyso-tracker в течение 30 мин, среду заменяли свежей культуральной средой и при этом обрабатывали серией фторированных соединений в разных концентрациях. Систему инкубировали в течение 10 минут, обрабатывали 4%-ным параформальдегидом в течение 30 минут и затем трижды промывали PBS по 10 минут каждый раз. Срезы запечатывали герметиком и визуализировали под микроскопом.

4. Результаты

4.1 Серия фторированных соединений ингибируют СВЕ-индуцированный апоптоз или гибель клеток SH-SY5Y

Эпоксид кондуритола В (СВЕ), ингибитор фермента GBA1, кодируемого геном лизосомальной глюкоцереброзидазы GBA, обычно используют в конструировании клеточных и животных моделей болезни Гоше (GD). Клетки SH-SY5Y обрабатывали 100 мкМ СВЕ в течение 24 ч. Клетки инкубировали с серией фторированных соединений в определенной концентрации согласно распределению по группам в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с использованием МТТ-анализа. Результаты показали, что по сравнению с группой, обработанной 100 мкМ СВЕ, жизнеспособность клеток в группе, обработанной совместно 50 нМ F2mPAO и 100 мкМ СВЕ, значительно увеличилась (Фиг. 26), что свидетельствует о том, что фторированные соединения в определенной концентрации оказывают защитное действие на индуцированный СВЕ апоптоз или гибель клеток SH-SY5Y.

4.2 Серия фторированных соединений промотируют лизосомный экзоцитоз

GD представляет собой распространенный класс лизосомных заболеваний накопления, и было проведено исследование, ослабляет ли серия фторированных соединений лизосомное накопление, индуцированное CBE, лизосомным маркером DND99 (Lyso-tracker red DND99). Результаты показали, что группа, обработанная 100 мкМ CBE, вызывает повышение интенсивности флуоресценции 100 мкМ CBE Lyso-tracker по сравнению с контрольной группой (ctrl) (Фиг. 27А-В), что свидетельствует о том, что обработка CBE приводит к лизосомному накоплению в клетках SH-SY5Y. По сравнению с группой, обработанной 100 мкМ CBE, жизнеспособность клеток значительно увеличилась, а интенсивность флуоресценции Lyso-Tracker значительно снизилась в группе, обработанной совместно 50 нМ F2mPAO и 100 мкМ CBE, в группе, обработанной совместно 50 нМ F2oPAO и 100 мкМ CBE, в группе, обработанной совместно 25 нМ F3PAO и 100 мкМ CBE, и в группе, обработанной совместно 50 нМ F3PAO и 100 мкМ CBE (Фиг. 27А-В).

Пример 10. Ингибирование высвобождения воспалительных факторов серией фторированных соединений

Клетки BV2 иммортализируют из мышинной микроглии путем ретровирусно-опосредованной трансфекции *v-raf/v-тус*, и они сохраняют различные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики микроглии. Стимуляцию клеток BV2 липополисахаридами (LPS) обычно используют для получения моделей воспалительных клеток в экспериментах, связанных с воспалением в нервной системе. В этом эксперименте LPS-стимулированные клетки BV2 использовали в качестве модели воспалительных клеток для определения воздействия фторированных соединений на экспрессию и секрецию воспалительных факторов, таких как фактор некроза опухоли α (TNF- α) и CD206.

1. Клеточная культура и обработка

Клетки BV2 культивировали в DMEM с высоким содержанием сахара с 10% FBS и инкубировали в инкубаторе клеточных культур при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч. Среду удаляли и заменяли средой DMEM с высоким содержанием сахара, содержащей 1 мкг/мл LPS (липополисахарид, приобретенный у Sigma, номер по каталогу L2880) (без FBS), и клетки также инкубировали совместно с фторированными соединениями в разных концентрациях согласно распределению по группам. Через 4 часа надосадочную жидкость собирали и центрифугировали для последующих экспериментов.

2. ELISA-анализ на фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) в мышинной модели

Набор для ELISA на фактор некроза опухоли альфа (TNF α) был приобретен у

компании Signalway Antibody LLC, номер по каталогу EK16997. Нижеследующие эксперименты проводят в соответствии с инструкциями к продукту:

1) приготовить стандарты, используя буфер-разбавитель, в концентрациях 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл и 0;

2) осторожно осциллировать реагент для детектирования А и реагент для детектирования В и использовать буфер-разбавитель для разбавления реагента А и реагента В до 1/100 маточного раствора до достижения концентрации рабочего раствора соответственно;

3) разбавить промывочный раствор деионизированной водой до 1/30 маточного раствора с образованием рабочего раствора;

4) в каждую лунку добавить по 100 мкл тестируемого образца или стандартного образца, запечатать планшет герметизирующей пленкой и инкубировать при 37°C в течение 2 часов;

5) удалить надосадочную жидкость без промывки;

6) добавить 100 мкл реагента для детектирования А в каждую лунку соответственно, запечатать планшет герметизирующей пленкой и инкубировать при 37°C в течение 1 часа;

7) отбросить надосадочную жидкость и промыть 3 раза 300 мкл рабочего раствора промывочного раствора, каждый раз делая перерыв на 2 минуты, и удалить как можно больше промывочного раствора, опрокинув планшет на впитывающую не пылящую бумагу;

8) добавить в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора реагента для детектирования В, запечатать планшет герметизирующей пленкой и инкубировать при 37°C в течение 1 часа;

9) промыть планшет 5 раз согласно стадии 7;

10) добавить по 90 мкл раствора субстрата в каждую лунку, наблюдать синюю жидкость в планшете, запечатать планшет герметизирующей пленкой и инкубировать при 37°C в течение 20 минут в защищенном от света месте;

11) добавить по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку, наблюдать, когда синяя жидкость станет желтой, запечатать планшет герметизирующей пленкой и смешивать не шейкере в течение 10 минут;

12) регистрировать значения поглощения образцов при длине волны 450 нм, используя микропланшет-ридер (транс-жидкостной микропланшет-ридер NOVostar).

3. Анализ методом иммуофлуоресцентного окрашивания

Клетки BV2 обрабатывали в течение 12 часов, надосадочную жидкость

аспирировали, и клетки трижды промывали фосфатным солевым буфером (PBS); добавляли 4%-ный параформальдегид (PFA) и оставляли стоять в течение 30 минут при комнатной температуре; 4%-ный PFA удаляли, и клетки трижды промывали PBS в течение 10 минут каждый раз; добавляли 0,3%-ный неионный детергент Triton-X (растворенный в PBS) и оставляли стоять в течение 30 мин при комнатной температуре; 0,3%-ный Triton-X аспирировали, добавляли блокирующий раствор на основе PBS, содержащий 10% козьей сыворотки (GS) и оставляли стоять в течение 1 ч при комнатной температуре; первичное антитело инкубировали в течение ночи при 4°C (первичное антитело разводили содержащим 10% GS блокирующим раствором в соотношении разведения 1:100 для TNF- α и 1:100 для CD206). На следующий день клетки промывали PBS 3 раза по 10 минут каждый раз, инкубировали с козьим вторичным антителом к IgG кролика Alexa Flour 555 (разводили с использованием блокирующего раствора в соотношении разведения 1:500, добавляли 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI)) в количестве 1 мкг/мл, оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 часов, добавляли PBS для промывки три раза, каждый раз в течение 10 минут, запечатывали с использованием герметика и затем наблюдали под микроскопом.

4. Статистический анализ

Обработку данных и статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism5, и данные выражали в виде среднего значения \pm стандартная ошибка (среднее \pm SEM). Различия между группами сравнивали с использованием однофакторного ANOVA, при этом $p < 0,03$ считали статистическим различием.

5. Результаты

Клетки BV2 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием сахара с 10% FBS и инкубировали в инкубаторе для клеточных культур при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч. Среду удаляли и заменяли средой DMEM с высоким содержанием сахара, содержащей 1 мкг/мл LPS, и клетки также инкубировали совместно с серией фторированных соединений в разных концентрациях согласно распределению по группам в течение 12 ч (Фиг. 28). Микроглии являются наиболее важными собственными иммунными клетками и основными эффекторными клетками в ЦНС. Они секретируют как нейротоксические, так и нейротрофические факторы в иммунном ответе на болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз, и оказывают как провоспалительное, так и противовоспалительное действие, с двумя поляризационными состояниями, M1 и M2. Для того чтобы исследовать роль серии фторированных соединений в LPS-индуцированной модели клеток BV2, осуществляли иммунофлуоресцентное окрашивание для маркера

микроглиальных клеток М1-типа TNF α и подавляющего воспаление маркера микроглиальных клеток М2-типа CD206. Результаты показали, что уровень экспрессии TNF α в клетках BV2 в группе, обработанной 1 мкг/мл LPS, значительно повысился по сравнению с контрольной группой, тогда как уровень экспрессии TNF α в группе, обработанной совместно 25 нМ F2mPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 12,5 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, и в группе, обработанной совместно 25 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, по сравнению с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, значительно снизился (Фиг. 29А-В). В отличие от уровня экспрессии TNF α при каждой обработке, уровень экспрессии CD206 в клетках BV2 в группе, обработанной 1 мкг/мл LPS, имел тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой, а в группах, обработанных F2mPAO, F2oPAO и F3PAO в определенной концентрации совместно с 1 мкг/мл LPS, наблюдалась тенденция к снижению уровня экспрессии CD206 по сравнению с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS (Фиг. 29А и 29С). Кроме того, путем вычисления отношения интенсивности сигнала CD206 к соответствующей интенсивности флуоресценции TNF- α анализ выявил, что по сравнению с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, отношение интенсивности флуоресценции CD206 к интенсивности флуоресценции TNF- α в группе, обработанной совместно 25 нМ F2mPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 12,5 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, и в группе, обработанной совместно 25 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, значительно увеличилось, что свидетельствует о том, что серия фторированных соединений в определенной концентрации промотирует поляризацию клеток BV2 М1-типа до М2-типа (Фиг. 30).

Для дополнительного тестирования, обладает ли серия фторированных соединений эффектом ингибирования воспаления, исследовали высвобождение воспалительных факторов в LPS-индуцированной модели клеток BV2, и концентрацию TNF- α в культуральной среде измеряли с использованием метода ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты были следующие: концентрация TNF- α в клеточной культуральной среде значительно увеличилась в группе, обработанной 1 мкг/мл LPS, по сравнению с контрольной группой (Фиг. 31). По сравнению с группой, обработанной 1 мкг/мл LPS, концентрация TNF- α в клеточной культуральной среде в группе, обработанной совместно 25 нМ F2mPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 50 нМ F2mPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 12,5 нМ F2oPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 25 нМ F2oPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 50 нМ F2oPAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 12,5 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, в группе, обработанной совместно 25 нМ F3PAO и 1 мкг/мл LPS, а также в группе, обработанной совместно 50 нМ

ФЗРАО и 1 мкг/мл LPS, значительно снизилась (Фиг. 31).

Пример 11: Фармакологическое исследование фторированных, дейтерированных соединений на линиях опухолевых клеток

1. Экспериментальные методы:

Настилка клеток

Подготавливали полную культуральную среду и хорошо перемешивали. Реанимированные опухолевые клетки-предшественники (Shanghai ChemPartner Co., Ltd.) пересеивали для получения примерно двух поколений и отбирали клеточную линию с хорошим статусом роста. Адгезивные клетки: среду удаляли аспирацией; клетки промывали трипсином один раз; отработанную жидкость отбрасывали; 3 мл свежего трипсина добавляли в колбу с культурой для расщепления. Когда клетки разрыхлились, отделяясь от стенок сосуда, для прерывания расщепления трипсином добавляли 8 мл полной среды и осторожно перемешивали. Клеточную суспензию пипетировали в центрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 4 минут. Суспендированные клетки: клеточную суспензию аспирировали в центрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 4 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали. Соответствующий объем среды добавляли в центрифужную пробирку и осторожно продували для ресуспендирования клеток. Количество клеток подсчитывали с использованием счетчика клеток Vi-Cell XR. Клеточную суспензию доводили до соответствующей концентрации.

Подготовка и добавление соединений в планшеты

Тестируемые соединения: соединения подготавливали в виде 10 мМ раствора в DMSO, и соединения разводили до 0,5 мМ раствора в DMSO. Соединения добавляли в соответствующие лунки с клетками с использованием прибора HPD300 и инкубировали в течение 72 часов в CO₂ инкубаторе.

Подготовка реагентов и тестирование

Буфер CellTiter-Glo размораживали при комнатной температуре. Лиофилизированный субстрат CellTiter Glo уравнивали до комнатной температуры. Буфер CellTiter-Glo добавляли к субстрату CellTiter Glo и тщательно смешивали. Планшет вынимали и уравнивали до комнатной температуры. 100 мкл смешанного реагента CellTiter Glo добавляли в каждую лунку, встряхивали в течение 10 минут вдали от света и инкубировали в течение 10 минут. Планшет с культурой помещали в Envision для считывания планшетов и регистрировали результаты показателей люминесценции; степень ингибирования вычисляли по следующей формуле: степень ингибирования (%) = $(1 - (\text{RLU соединение} - \text{RLU холостой контроль}) / (\text{RLU DMSO} - \text{RLU холостой контроль})) \times 100$

100% (RLU – относительная световая единица). Строили фармакодинамическую кривую степени ингибирования и вычисляли значения IC_{50} с использованием XLFit. Использовали 4-параметрическую модель $[fit = (A + ((B-A) / (1 + (C/x)^D)))]$.

2. Результаты:

Таблица 8. Сравнение дейтерированных соединений в ингибировании пролиферации опухолевых клеток

Линия клеток		d1PAO	d2PAO	d3PAO	Стауро- спорин
		IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)
CCRF-CEM	Острый лимфоидный Т-клеточный лейкоз	33,51	31,92	23,85	8,05
KS-1	Глиобластома	43,47	45,94	30,94	2,25
NOMO-1	Острый миелоидный лейкоз (AML)	58,08	59,40	40,98	16,02
RD	Злокачественная эмбриональная рабдомиосаркома	26,67	25,74	18,58	4,79
SUP-B15	Острый лимфоидный В-клеточный лейкоз	34,24	33,57	22,94	10,78
TT	Медуллярная карцинома щитовидной железы	109,41	107,06	75,39	83,92
CCF-STTG1	Церебральная астроцитома	107,52	130,27	94,68	9,10
IMR-32	Нейробластома	23,28	24,08	14,44	4,19
REN	Острая не-В или не-Т-клеточная лимфома	22,81	22,43	18,55	8,08
AN3 CA	Аденокарцинома эндометрия	39,86	40,66	28,59	35,83

Как показано в Таблице 8, d1PAO, d2PAO и d3PAO все продемонстрировали ингибирующее воздействие на протестированные опухолевые клетки. d1PAO и d2PAO оба имели схожую ингибирующую IC_{50} , а d3PAO превосходил первые два. Все три продемонстрировали самое сильное ингибирующее воздействие на глиобластома, нейробластома, острый лимфоидный Т-клеточный лейкоз, острую не-В- или не-Т-

клеточную лимфому, острый лимфоидный В-клеточный лейкоз, злокачественную эмбриональную рабдомиосаркому и аденокарциному эндометрия с IC_{50} менее 50 нМ; относительно сильное ингибирующее воздействие на клетки острого миелоидного лейкоза с IC_{50} 50-100 нМ; самое слабое ингибирующее воздействие на клетки медуллярной карциномы щитовидной железы и церебральной астроцитомы с $IC_{50} > 100$ нМ.

Таблица 9. Сравнение фторированных соединений в ингибировании пролиферации опухолевых клеток

Линия клеток		F2oPAO	F3PAO	Стауроспорин
		IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)
CCRF-CEM	Острый лимфоидный Т-клеточный лейкоз	33,79	34,81	8,05
KS-1	Глиобластома	42,15	36,27	2,25
NOMO-1	Острый миелоидный лейкоз (AML)	60,18	48,23	16,02
RD	Злокачественная эмбриональная рабдомиосаркома	28,90	26,68	4,79
SUP-B15	Острый лимфоидный В-клеточный лейкоз	25,86	25,99	10,78
TT	Медуллярная карцинома щитовидной железы	119,51	94,77	83,92
CCF-STTG1	Церебральная астроцитома	104,32	106,61	9,10
IMR-32	Нейробластома	24,88	19,08	4,19
REN	Острая не-В или не-Т-клеточная лимфома	22,31	26,75	8,08
AN3 CA	Аденокарцинома эндометрия	40,83	39,72	35,83

Как показано в Таблице 9, F2oPAO и F3PAO оба демонстрируют ингибирующее воздействие на протестированные опухолевые клетки с аналогичными ингибирующими IC_{50} . Оба продемонстрировали самое сильное ингибирующее воздействие на глиобластома, нейробластома, острый лимфоидный Т-клеточный лейкоз, острую не-В- или не-Т-клеточную лимфому, острый лимфоидный В-клеточный лейкоз, злокачественную

эмбриональную рабдомиосаркому и аденокарциному эндометрия с IC_{50} менее 50 нМ; относительно сильное ингибирующее воздействие на клетки острого миелоидного лейкоза с IC_{50} 50-100 нМ; самое слабое ингибирующее воздействие на клетки медуллярной карциномы щитовидной железы и церебральной астроцитомы с $IC_{50}>100$ нМ.

Таблица 10. Сравнение фторированных соединений в ингибировании пролиферации опухолевых клеток

Линия клеток		F2oPAO	F2mPAO	F3PAO	Стауро- спорин
		IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)	IC_{50} (нМ)
HeLa	Рак шейки матки	105,12	126,27	113,40	13,5
SK-HEP-1	Рак печени	42,98	50,43	60,43	16,9
MCF7	Рак молочной железы	101,80	116,52	150,03	39,4
MDA-MB-231	Рак молочной железы	101,26	46,02	150,36	13,4
A549	Рак легкого	126,86	160,27	>200	13,1
NCI-H1299	Рак легкого	99,93	146,70	165,32	9,2
HT-29	Рак ободочной кишки	92,66	139,68	155,07	15,5
A-431	Рак кожи	139,58	>200	>200	21,1
NCIN87 [N87]	Рак желудка	80,89	117,15	110,96	10,6
HCC827	Рак легкого	95,68	144,27	155,97	16,1
EL4	T-клеточная лимфома	49,83	65,58	68,83	24
Daudi	Рак крови	40,84	59,16	69,53	15,5
U-2 OS	Рак кости	29,23	42,36	44,92	5,3
Jurkat, Clone E6-1	Рак крови	72,48	74,96	105,05	21,4
K-562	Миелома	48,59	59,32	86,50	47
HL-60	Рак крови	53,72	48,23	64,85	24,5
SK-OV-3	Рак яичника	112,52	159,35	185,11	28
U-937	Лимфома	86,74	139,53	120,58	13,9
NAMALWA	Рак крови	31,27	39,30	48,80	19,9

KG-1	Миелома	84,22	85,27	118,49	15,6
A-375	Меланокарцинома	29,62	41,73	45,57	18

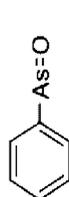
Как показано в Таблице 10, три фторированных соединения продемонстрировали ингибирующее воздействие на протестированные опухолевые клетки с аналогичными ингибирующими IC_{50} , хотя F2oPAO имел несколько более низкую IC_{50} . Все три продемонстрировали самое сильное ингибирующее воздействие на клетки U2-OS, NAMALWA и A-375 с IC_{50} менее 50 нМ; относительно сильное ингибирующее воздействие на клетки SK-HEP-1, Daudi, K562, HL-60, Jurkat, Clone E6-1, NAMALWA с IC_{50} 50-100 нМ; самое слабое ингибирующее воздействие на клетки A-431. IC_{50} для остальных клеток находилась в диапазоне 100-200 нМ.

Пример 12. Воздействие понижающей регуляции ингибиторов PI4KIIIa и PI4KIIIa PAO и F3PAO на повреждение клеточных тканей, вызванное воздействием радиации

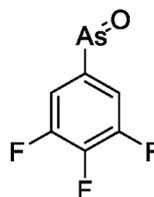
В этом эксперименте были использованы мыши C57BL/6 в возрасте 6-8 недель, массой тела 20-23 г. Мышей распределяли по группам по их массе тела. После распределения по группам мышей анестезировали и затем мышей в группах G2-G4 подвергали однократному общему облучению тела в дозе 15 Гр (грей) с использованием рентгеновских лучей. День моделирования был определен как День 0. У всех животных собирали периферическую кровь для подсчета лейкоцитов в день распределения по группам, через 1, 3, 5, 7 дней после облучения и в день забора крови. В дальнейшем мышей еженедельно взвешивали и исследовали секрецию слюны.

Экспериментальные материалы и методы

Тестируемое соединение: оксид фениларсина (PAO) и фторированный оксид фениларсина (F3PAO)



PAO



(F3PAO)

Приготовление тестируемого соединения

Поскольку тестируемое соединение чувствительно к свету, эксперимент проводили с осторожностью, избегая сильного освещения.

а. Приготовление маточного раствора F3PAO (0,9 мг/мл)

При слабом освещении 9 мг порошка F3 взвешивали на бумаге для взвешивания,

помещали в коричневый стеклянный флакон и добавляли 10 мл растворителя, среднепечечной жирной кислоты (МСТ); в смесь помещали чистую мешалку, и смесь перемешивали с использованием ультразвука в течение 1-5 минут вдали от света. Раствор перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 1-2 часов на водяной бане (не выше 50°C) вдали от света до тех пор, пока раствор не становился чистым и прозрачным. Маточный раствор хранили в следующих условиях: хранили в холодильнике (2-8°C) вдали от света в течение одного года.

b. Приготовление рабочего раствора F3PAO (0,15 мг/кг/день) (60 мл) 0,015 мг/мл:

При слабом освещении брали 1,0 мл маточного раствора F3, добавляли 59 мл растворителя (МСТ) и смешивали. Раствор хранили в холодильнике (2-8°C) вдали от света в течение одного года.

c. Приготовление маточного раствора PAO (0,9 мг/мл):

При слабом освещении 9 мг порошка PAO взвешивали на бумаге для взвешивания, помещали в коричневый стеклянный флакон и добавляли 10 мл растворителя, среднепечечных триглицеридов (МСТ) (Beijing Fengli Jingqiu Pharmaceutical Co., Ltd.); в смесь помещали чистую мешалку, и смесь перемешивали с использованием ультразвука в течение 1-5 минут вдали от света. Раствор перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 1-2 часов на водяной бане (не выше 50°C) вдали от света до тех пор, пока раствор не становился чистым и прозрачным. Маточный раствор хранили в следующих условиях: хранили в холодильнике (2-8°C) вдали от света в течение одного года.

d. Приготовление рабочего раствора PAO (0,3 мг/кг/день) (90 мл) 0,03 мг/мл:

При слабом освещении брали 3,0 мл маточного раствора PAO, добавляли 87 мл растворителя (МСТ) и смешивали. Раствор хранили в холодильнике (2-8°C) вдали от света в течение одного года.

Животные, распределение по группам и режим дозирования

В общей сложности 44 самца мышей C57BL/6, из которых 4 были резервными животными, были приобретены у Shanghai Jihui. После акклиматизации в помещении для животных PharmaLegacy SPF в течение 3 дней животных с массой тела в соответствующем диапазоне отбирали для распределения по группам. После распределения по группам остальных резервных животных умерщвляли избытком углекислого газа в конечной точке эксперимента. Животные не имели специфических патогенов и поступили в помещение для животных PharmaLegacy примерно через 6-8 недель. Протоколы экспериментов, предназначенные для применения к животным, одобрены PharmaLegacy IACUC (Комитет по уходу за экспериментальными животными и

их использованию).

Выращенные в экологически чистой среде гетерозиготные мыши с мутацией PI4KA (кодирующая PI4KIII α) [(Pi4kaGt(RRO073)^{Byg/+}] (MMRRC, кат. #016351-UCD) в возрасте примерно 7 месяцев и мыши из того же помета дикого типа были использованы для группы PI4K^{-/+} и контрольной группы соответственно.

Животных случайным образом назначали в каждую группу лечения, основываясь на их массе тела, с использованием функции случайного распределения BioBook, чтобы приблизить среднюю массу тела каждой группы и уменьшить межгрупповое расхождение. Информация о распределении по группам и дозировке подробно изложена в нижеследующей таблице:

Распределение по группам и режим дозирования

Группа ^a	Облучение рентгеновскими лучами	Пероральный зонд	Количество животных	Доза рентгеновского излучения (Гр/мышь)	Концентрация мг/мл	Параметры введения через пероральный зонд ^a	
						мл/кг	мг/кг
Нормальная группа	Нет	N/A	10	N/A	N/A	10	N/A
Группа модель-носитель	Да	МСТ	10	15	N/A	10	N/A
Группа PAO	Да	PAO	10	15	0,03	10	0,3 п.о., ежедневно
Группа F3PAO	Да	F3PAO	10	15	0,015	10	0,15 п.о., ежедневно

a. Дозирование начинали в день распределения по группам и продолжали в течение 2 недель.

N/A – нет данных

п.о. - перорально

Облучение рентгеновскими лучами

Мышей анестезировали в течение 4 ч. Брали кровь для последующего тестирования на лейкоциты в крови, и затем каждой группе мышей давали дозу облучения 15 Гр, используя рентгеновские лучи. День моделирования был определен как День 0.

Обследование после облучения рентгеновскими лучами

Измерение массы тела: массу тела измеряли два раза в неделю до облучения рентгеновскими лучами и три раза в неделю в течение 3 недель после облучения.

Секреция слюны: мышей C57BL/6 распределяли по группам и измеряли секрецию слюны путем сбора слюны в пределах 10 минут после инъекции пилокарпина (Alladin, лот № D1929095, номер по каталогу P129614) в День -1 до моделирования и В Дни 7, 14 и 90 после моделирования соответственно.

Подсчет лейкоцитов: после того, как животные получили анестезию 2-5%-ным изофлураном, из глазниц всех животных собирали по 50 микролитров цельной крови, добавляли антикоагулянт EDTA-K2, и количество лейкоцитов измеряли с использованием прибора для рутинного анализа крови. Рутинные анализы крови проводили в день распределения по группам перед дозированием, через 4 часа после дозирования и перед облучением, и в Дни 3, 5, 7, 14, 30, 60 и 90 после облучения.

Сбор образцов: в конечной точке теста (в День 90 после облучения) после анестезии 2-5%-ным изофлураном из глазниц всех животных собирали наибольшее количество цельной крови, добавляли антикоагулянт EDTA-K2, и плазму отделяли центрифугированием с использованием центрифуги при 1000 g в течение 10 мин при 4°C и хранили при -80°C для последующего использования. После того, как образцы крови были собраны, мыши получали транскардиальную перфузию предварительно охлажденным PBS и 4%-ным параформальдегидом, и затем ткани и органы, такие как слюнные железы, ткани легких и т.д., извлекали и собирали, фотографировали и взвешивали и затем повторно фиксировали формалином *in vitro*, дегидратировали и заделывали в парафин для последующего патологического тестирования.

Клиническое обследование: во время испытания, если у животных наблюдалась значительная потеря массы тела (более 15%) или другие аномалии, то им безотлагательно вводили агар и глюкозный физиологический раствор (10 мл/кг, подкожная инъекция, 1-2 раза в сутки) и регистрировали инфузию жидкости.

Статистический анализ

Результаты будут представлены в виде среднего значения \pm SEM. Тесты будут осуществлены с использованием соответствующих статистических методов. Статистически значимым различие будет считаться, если $P < 0,05$.

Результаты

Как показано в Таблице 11, в День 7 после облучения рентгеновскими лучами масса и объем слюны в группе модель-носитель значительно уменьшились по сравнению с нормальной группой, в то время как масса и объем в группе PAO не имели значительного изменения и массу и были значительно выше, чем в группе модель-

носитель; объем слюны в группе ФЗРАО не имел значительного изменения, но масса слюны значительно уменьшилась, но все они имели тенденцию к увеличению по сравнению с группой модель-носитель. В День 7 после облучения рентгеновскими лучами, по сравнению с их собственными парами в День -1, масса и объем слюны каждого животного не уменьшились в нормальной группе и имели значительное увеличение; в группе модель-носитель наблюдалось большое и значимое снижение; в группе РАО не было значительного изменения; и в группе ФЗРАО наблюдалось значительное снижение, но величина была относительно небольшой. Эти результаты свидетельствуют о том, что лечение с использованием РАО и ФЗРАО может ослаблять повреждение слюнных желез и снижение секреции слюны, вызванное радиации.

Как показано в Таблице 11, уровни лейкоцитов в крови в группе модель-носитель, в группе РАО и в группе ФЗРАО значительно снизились, по сравнению с нормальной группой через 3, 5 и 7 дней после облучения рентгеновскими лучами, с самым низким уровнем в День 3 и некоторым восстановлением в Дни 5 и 7. Тем не менее, в Дни 3 и 5 уровни лейкоцитов в крови в группах РАО и ФЗРАО значительно увеличивались или имели тенденцию к увеличению по сравнению с уровнями лейкоцитов в группе модель-носитель; в День 7 не было значительного различия уровней лейкоцитов в крови в группе модель-носитель, в группе РАО и в группе ФЗРАО. Эти результаты свидетельствуют о том, что лечение с использованием РАО и ФЗРАО может ослаблять снижение уровней лейкоцитов, вызванное воздействием радиации.

Как показано в Таблице 11, масса тела в группе модель-носитель, в группе РАО и в группе ФЗРАО значительно снизилась по сравнению с нормальной группой через 3, 5 и 7 дней после облучения рентгеновскими лучами с наименьшей массой тела в День 5 и некоторым восстановлением в День 7. Тем не менее, в Дни 3 и 5 масса тела в группах РАО и ФЗРАО значительно увеличилась или имела тенденцию к увеличению по сравнению с массой тела в группе модель-носитель. Эти результаты свидетельствуют о том, что лечение РАО и ФЗРАО ослабляет потерю массы тела, вызванную воздействием радиации.

Поскольку доза РАО, введенная группе РАО, составляла 0,3 мг/кг/сутки, доза ФЗРАО, введенная группе ФЗРАО, составляла 0,15 мг/кг/сутки, и поскольку молекулярная масса ФЗРАО была на 30% выше, чем у РАО, молярное количество лекарственного средства, введенного группе ФЗРАО, составляло только 35% от количества, введенного группе РАО, приведенные выше результаты не могут указывать на то, что эффект РАО против повреждения, вызванного радиоактивными лучами, был сильнее, чем эффект ФЗРАО.

Таблица 11. Эффекты РАО и ФЗРАО в отношении повреждения клеточных тканей,

вызванного облучением рентгеновскими лучами

Время	Тестируемый показатель	Нормальная группа (10 мышей)	Группа модель-носитель (10 мышей)	Группа РАО (10 мышей)	Группа ФЗРАО (10 мышей)
День -1	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	8,75±0,6	9,36±0,71	10,17±0,82	9,95±0,74
	Масса тела (г)	20,97±0,19	20,89±0,21	20,89±0,19	20,94±0,19
	Масса слюны (г)	0,147±0,006	0,148±0,004	0,146±0,003	0,145±0,002
	Объем слюны (мкл)	95,3±5,6	93,4±3,5	92,0±2,9	93,2±2,3
День 0	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	8,25±0,73	6,53±0,45	8,67±0,85	8,67±0,54
День 3	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	8,05±0,46	###0,42±0,02	###0,71±0,09*	###0,49±0,07
	Масса тела (г)	20,42±0,17	###18,82±0,23	###19,23±0,19	###19,4±0,17
День 5	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	9,93±0,54	###1,09±0,1	###1,44±0,13*	###1,15±0,07
	Масса тела (г)	20,71±0,21	###18,58±0,18	###18,74±0,23	###19,22±0,19*
День 7	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	10,03±0,52	###1,36±0,11	###1,39±0,14	###1,36±0,13
	Масса тела (г)	21,15±0,2	###19,13±0,24	###19,31±0,24	###19,2±0,28
	Масса слюны (г)	0,178±0,014 ^Y	###0,089±0,01 ^{YYY}	0,142±0,013**	0,107±0,016 ^Y
	Объем слюны (мкл)	127,0±12,3 ^Y	###47,1±6,3 ^{YYY}	97,6±11,5**	##64,3±11,8 ^Y
День 14	Количество лейкоцитов ($10^9/л$)	8,66±0,73	###1,13±0,11	###1,09±0,15	###1,17±0,13

Масса тела (г)	22,44±0,29	###20,41± 0,25	###20,33±0,28	###20,29±0,29
Масса слюны (г)	0,21±0,02 ^Y	###0,09±0,02	#0,14±0,01***	##0,13±0,01*
Объем слюны (мкл)	155,52±22,44 ^Y	###44,73±3,75	#94,33±9,12***	##81,99±12,06** *

Критерий Стьюдента, “###”= P<0,001 и “#”= P<0,05 (по сравнению с нормальной группой), “*”= P<0,1 и “***”= P<0,01 (по сравнению с группой модель-носитель), “YYY”= P<0,001 и “Y”= P<0,05 (по сравнению с их собственными парами в День -1)

Пример 13. Воздействие РАО на образование атеросклеротических пенных клеток

Атеросклероз является самым распространенным типом сердечно-сосудистых заболеваний, характеризующимся образованием атеромы или фиброзной бляшки в эндотелии кровеносных сосудов, которые в основном поражают крупные и средние артерии, что приводит к уплотнению стенок, сужению просвета и ослаблению эластичности, вызывая ишемические изменения в соответствующих органах. Образование пенистых клеток происходит на всем протяжении развития атеросклероза и является отличительным признаком атеросклероза. Причиной образования пенистых клеток является дисбаланс трех основных взаимосвязанных биологических процессов: захвата липидов, этерификации холестерина и эффлюкса холестерина. Увеличение захвата липидов и этерификации холестерина и неадекватный эффлюкс холестерина приводят к чрезмерному накоплению холестероловых эфиров (СЕ) в макрофагах, что приводит к образованию пенистых клеток.

Важнейший аспект патологического механизма атеросклероза опосредован макрофагами. Когда липопротеины низкой плотности (LDL) в крови проходят через щели в артериальном эндотелии или посредством активного транспорта сосудистыми эндотелиальными клетками, они депонируются субэндотелиально и окисляются с образованием окисленных липопротеинов низкой плотности (ox-LDL). Субэндотелиальные ox-LDL могут связываться с рецепторами на мембранах макрофагов (например, SR-A, CD36, LOX-1) и затем захватываться клеткой, где они расщепляются лизосомной кислой липазой с образованием холестероловых эфиров. Холестероловые эфиры могут дополнительно генерировать свободный холестерин и свободные жирные кислоты. Избыток свободного холестерина оказывает токсическое воздействие на клетки. Свободный холестерин, в свою очередь, переэтерифицируется до холестероловых эфиров в эндоплазматическом ретикулуме ацетилкофермент А-ацетилтрансферазой 1 (ACAT1) и ацетилкофермент А-ацетилтрансферазой 2 (ACAT2), что приводит к образованию

липидных капель, присутствующих в больших количествах в пенистых клетках, что может быть выявлено путем окрашивания красителем масляный красный О. Пенные клетки, происходящие из макрофагов, могут образовываться, когда содержание холестероловых эфиров в макрофагах превышает 50% от общего содержания холестерина. По мере прогрессирования заболевания гладкомышечные клетки из артериальной интимы мигрируют в интиму через пору-окно эндоэластической мембраны и липиды фагоцитоза, образуя миогенные пенные клетки. Гладкомышечные клетки пролиферируют и мигрируют и синтезируют внеклеточный матрикс, фиброзное утолщение. Пенные клетки подвергаются некрозу и распадаются с образованием атероматозного некротического материала, и образуется атероматозная бляшка.

1. PAO и его производные снижают образование липидных капель после захвата макрофагами окисленного липопротеина низкой плотности

Методы эксперимента:

1) Клеточная культура: клетки THP-1 были приобретены в Шанхайском клеточном банке Китайской академии наук, помещены в инкубатор с температурой 37°C, 5% CO₂, с использованием среды RPMI 1640 (Gibco C11875500BT) + 10% FBS (Gibco 10099141C), и их пересевали каждые 3 дня.

2) Индуцирование дифференцировки: брали клетки THP-1 в логарифмической фазе роста, их продували и тщательно смешивали, и PMA (Sigma P1585) добавляли в среду так, чтобы конечная концентрация PMA составляла 100 нМ. Клеточную суспензию вносили в 24-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. В дальнейшем клетки наблюдали под микроскопом, и клетки переходили из суспендированного состояния в состояние прикрепления к стенкам и вытянутые псевдоподии.

3) Распределение по группам и обработка: После индуцированной дифференцировки клетки случайным образом разделяли на шесть групп: контрольная группа, модельная группа, модель + 10 нМ PAO, модель + 20 нМ PAO, модель + 40 нМ PAO, модель + 60 нМ PAO. Контрольную группу инкубировали со средой без сыворотки в течение 2 дней, и модельную группу инкубировали со средой без сыворотки, содержащей 60 мкг/мл ox-LDL (Guangzhou Yiyuan Bio, YB-002) в течение 2 дней. Группу обработки лекарственным средством культивировали с использованием среды без сыворотки, содержащей 60 мкг/мл ox-LDL, в течение 1 дня, и затем эту среду заменяли средой без сыворотки, содержащей 60 мкг/мл ox-LDL и PAO в разных концентрациях, и продолжали культивировать в течение 1 дня.

4) Окрашивание красителем масляный красный О: После окончания обработки клетки дважды промывали PBS, добавляли 4%-ный раствор параформальдегида для

фиксации в течение 30 минут при комнатной температуре и после фиксации дважды промывали PBS. Затем клетки окрашивали с использованием модифицированного набора для окрашивания красителем масляный красный О (Vyotime C0158S). Клетки покрывали добавленным промывочным раствором для окрашивания в течение 20 секунд. Промывочный раствор для окрашивания удаляли; добавляли рабочий раствор для окрашивания красителем масляный красный О; и клетки окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре; и затем рабочий раствор для окрашивания красителем масляный красный О Рабочий раствор удаляли. Добавляли соответствующее количество промывочного раствора для окрашивания; клетки отдыхали в течение 30 секунд; затем промывочный раствор для окрашивания удаляли; и клетки промывали PBS в течение 20 секунд. Клетки равномерно покрывали PBS, наблюдали и фотографировали под микроскопом.

Результаты:

Как показано на Фиг. 32, сигнал окрашивания красителем масляный красный О в клетках ТНР-1, дифференцированных обработкой ox-LDL (модель), был сильнее, чем в клетках, не обработанных ox-LDL (контроль), что указывает на внутриклеточное накопление липидных капель, и это внутриклеточное накопление липидных капель может быть заметно ослаблено PAO дозозависимым образом (M+PAO). F2mPAO и F3PAO также имели такую же функцию.

2. PAO и его производные промотируют клиренс флуоресцентно меченых окисленных липопротеинов низкой плотности, захваченных макрофагами

Методы эксперимента:

1) Клеточная культура: клетки ТНР-1 были приобретены в Шанхайском клеточном банке Китайской академии наук, помещены в инкубатор с температурой 37°C, 5% CO₂, с использованием среды RPMI 1640 (Gibco C11875500BT) + 10% FBS (Gibco 10099141C), и их пересеивали каждые 3 дня.

2) Индуцирование дифференцировки: брали клетки ТНР-1 в логарифмической фазе роста, их продували и тщательно смешивали, и PMA (Sigma P1585) добавляли в среду так, чтобы конечная концентрация PMA составляла 100 нМ. Клеточную суспензию вносили в 24-луночные планшеты с «клетками-гусеницами» и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. После этого клетки наблюдали под микроскопом, и клетки переходили из суспендированного состояния в состояние прикрепления к стенкам и вытянутые псевдоподии.

3) Распределение по группам и лечение: После индуцированной дифференцировки клетки обрабатывали средой без сыворотки в течение 18 часов и затем случайным образом

разделяли на четыре группы: группа Dil-ox-LDL, группа PAO 20 нМ, группа PAO 40 нМ, группа PAO 60 нМ. Группу Dil-ox-LDL инкубировали в среде без сыворотки, содержащей 40 мкг/мл Dil-ox-LDL (Guangzhou Yiyuan Bio, YB-010), в течение 7 часов. Группу обработки лекарственным средством культивировали со средой без сыворотки, содержащей 40 мкг/мл Dil-ox-LDL, в течение 6 часов, и затем в среду добавляли PAO в разных концентрациях и продолжали инкубирование в течение 1 часа.

4) Фиксация и получение срезов: После обработки клетки дважды промывали PBS, добавляли 4%-ный раствор параформальдегида для фиксации в 30 минут при комнатной температуре и после фиксации дважды промывали PBS. Клетки окрашивали окрашивающим раствором DAPI в течение 10 минут при комнатной температуре и дважды промывали PBS после окрашивания. Клетки извлекали из 24-луночного планшета для получения срезов.

5) Наблюдение и фотографирование под лазерным конфокальным микроскопом.

Результаты:

Как показано на Фиг. 33, клетки THP-1 могут захватывать большое количество флуоресцентно меченого ox-LDL (Dil-ox-LDL), и PAO промотирует клиренс Dil-ox-LDL в клетках THP-1 дозозависимым образом.

Пример 14. Бактериостатическая активность PAO и его производных *in vitro*

Штаммы, предназначенные для тестирования, а также тесты были предоставлены и осуществлены компанией WuXi AppTec Shanghai. Тестируемые соединения PAO, d5PAO и F3PAO подготавливали в виде маточного раствора в концентрации 64 мкг/мл и затем добавляли в чашки Петри с патогенными бактериями в градиентном разведении. *In vitro* минимальная ингибирующая концентрация (MIC) соединений против патогенных бактерий относится к стандартному методу, предоставленному Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Определение чувствительности аэробных бактерий к лекарственным средствам *in vitro* относится к CLSI M07, M100; определение чувствительности анаэробных бактерий лекарственным средствам *in vitro* относится к CLSI M11, M100; определение чувствительности *Helicobacter pylori* к лекарственным средствам *in vitro* относится к CLSI M100; определение чувствительности грибов к лекарственным средствам *in vitro* относится к CLSI M27, M38, M60; и MIC-тестирование на *Trichomonas vaginalis* относится к эталону (Mohammad MATINI & Amir Hossein MAGHSOOD. 2016. *In vitro* susceptibility of Iranian Isolates of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole. Iran J Parasitol. Vol. 11, No 1, Jan-Mar 2016, pp. 46-51. UPCROFT, J.A. & UPCROFT P. 2001. Drag susceptibility testing of anaerobic protozoa. Antimicrob Agents

Chemother, 45, 1810-4).

Микрофлюидный метод разведения: рост бактерий наблюдали визуально после инкубирования в средах, содержащих последовательные разведения (например, в ионно-регулируемой бульонной среде Миллера-Хинтона). Наименьшую точку концентрации соединения, при которой рост бактерий значительно или полностью ингибируется при визуальном наблюдении, определяли как минимальную ингибирующую концентрацию соединения.

Агаровый метод разведения: Рост бактерий наблюдали визуально после инкубирования в планшетах с твердыми средами, содержащих последовательные разведения соединений (например, с твердой средой колонии *Brucella*, дополненной 5 мкг/мл гемина, 1 мкг/мл витамина К1 и 5% асептической дефибриллированной лизированной лошадиной крови). Наименьшую точку концентрации соединения, при которой рост бактерий значительно или полностью ингибируется при визуальном наблюдении, определяли как минимальную ингибирующую концентрацию соединения.

Разные штаммы противомикробных средств широкого спектра действия, которые обычно применяются в клинической практике, используют в качестве положительного контроля. Линезолид является антибактериальным агентом, ингибирующим инфекции, вызванные грамположительными (G+) кокками; колистин обладает широким антибактериальным спектром действия, особенно против грамотрицательных бактерий, и менее токсичен. Вориконазол представляет собой триазольное противогрибковое соединение, которое действует на тяжелые грибковые инфекции. Ципрофлоксацин представляет собой хинолоновое антибактериальное лекарственное средство, обладающее широким спектром антибактериального действия против *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Gonococcus gonorrhoeae*, *Streptococcus*, *Legionella*, *Staphylococcus aureus*. Антибактериальный спектр кларитромицина аналогичен антибактериальному спектру эритромицина. Клиндамицин клинически применяется при абдоминальных и гинекологических инфекциях, вызванных анаэробными бактериями, и является лекарственным средством первого выбора для лечения остеомиелита, вызванного *Staphylococcus aureus*. Метронидазол в основном применяется для лечения или предупреждения системных или локализованных инфекций, вызываемых анаэробными бактериями, и он также эффективен при сепсисе, эндокардите, менингеальных инфекциях и колите, вызванном применением антибиотиков.

Результаты:

Таблица 12. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) (мкг/мл) d5РАО, РАО и F3РАО против патогенных бактерий

Название и номер штамма резистентного штамма	*d5PAO	PAO	F3PAO	Линезолид	Колистин	Ворико-назол	Ципро-флоксацин
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51575	0,125	0,125	0,25	2	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 700221	0,125	0,25	0,25	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> NRS 384	≤0,0625	≤0,002	≤0,002	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> VRS1	≤0,002	≤0,002	≤0,002	4	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35983 (≤0,002	≤0,002	≤0,002	2	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC-BAA-1605	2	1	0,5	-	0,5	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC BAA-2469	≤0,0625	≤0,0625	0,125	-	0,25	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	0,5	0,25	1	-	0,5	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC BAA-1143	1	1	1	-	0,25	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 13437	0,25	0,25	1	-	0,5	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876	2	2	0,5	-	-	0,03	-
<i>Candida albicans</i> ATCC-MYA-574	2	2	1	-	-	1	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC	1	1	1	-	-	0,03	-

22019							
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC MYA-4609	8	4	2	-	-	1	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	≤0,0625	≤0,0625 5	0,125	-	-	-	0,008
Название и номер штамма резистентного штамма	*d5РАО	РАО	ФЗРАО	Ворико-назол	Кларитромицин	Клиндамицин	Метронидазол
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 208821	0,06	0,06	0,016	0,03	-	-	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	0,125	0,25	0,25	-	0,03	-	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700392	0,125	0,125	0,25	-	0,03	-	
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700824	0,25	0,25	0,25	-	0,03	-	
<i>Bacterioides fragilis</i> ATCC 25285	0,125	0,125	0,25	-	-	1	
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 700057	0,5	0,5	0,5	-	-	>2	
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 17891	0,125	0,125	0,25	-	-	0,03	
<i>Gardnerella vaginalis</i> (Gardner and Dukes) ATCC 14018	0,125	0,125	0,25	-	-	0,125	
<i>Propionibacterium acnes</i> (<i>Cutibacterium acnes</i>) ATCC 11827	0,125	0,125	0,25	-	-	0,0625	
<i>Atopobium vaginae</i> Rodriguez Jovita et	0,006	0,003	0,006	-	-	0,008	

<i>al, ATCC BAA-55</i>							
<i>Peptostreptococcus anaerobius ATCC 27337</i>	0,25	0,25	0,25	-	-	0,5	
<i>Trichomonas vaginalis ATCC 30236</i>	0,25	0,25	0,125	-	-	-	0,25
Название и номер штамма резистентного штамма	d5РАО	РАО	ФЗРАО	Колистин	Левофлоксацин		
<i>Escherichia coli ATCC BAA-2469</i>	0,0625	0,0625	0,25	0,5	16		
<i>Acinetobacter baumannii WX-AB003</i>	0,125	0,125	0,25	0,5	16		
<i>Acinetobacter baumannii WX-AB004</i>	0,25	0,125	0,25	1	0,125		
<i>Acinetobacter baumannii WX-AB006</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25		
<i>Acinetobacter baumannii WX-AB019</i>	0,25	0,125	0,25	0,25	1		
<i>Citrobacter kirschneri WX-C,kirschner001</i>	≤0,0625	≤0,0625 5	0,25	0,25	>16		
<i>Enterobacter cloacae WX-E,cloacae001</i>	≤0,0625	0,125	0,25	0,25	0,0625		
<i>Enterobacter cloacae WX-E,cloacae002</i>	2	2	2	0,25	0,03125		
<i>Enterobacter cloacae WX-</i>	0,125	0,125	0,25	0,25	0,5		

<i>E.cloacae003</i>							
<i>Escherichia coli</i> <i>WX-EC008</i>	≤0,0625	0,125	0,125	0,5	16		
<i>Escherichia coli</i> <i>WX-EC018</i>	≤0,0625	≤0,0625 5	0,25	0,25	16		
<i>Escherichia coli</i> <i>WX-EC021</i>	1	1	1	0,25	16		
<i>Escherichia coli</i> <i>WX-EC022</i>	0,125	0,125	0,25	0,25	0,5		
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>WX-K,oxytoca001</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	16		
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>WX-K,oxytoca002</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	0,5		
<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>WX-K,oxytoca003</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	0,5		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>WX-KP013</i>	0,5	0,5	1	0,5	>16		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>WX-KP021</i>	0,125	0,125	0,5	0,25	0,0625		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>WX-KP037</i>	≤0,0625	0,125	0,25	0,25	>16		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>WX-KP041</i>	≤0,0625	≤0,0625 5	1	0,25	1		
<i>Morganella morgani</i> <i>WX-M,morgani001</i>	0,5	0,5	2	>16	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>WX-PA008</i>	0,5	0,5	4	1	>16		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>WX-PA013</i>	0,5	0,5	2	1	1		
<i>Pseudomonas</i>	0,5	0,5	1	1	1		

<i>aeruginosa WX-PA015</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa WX-PA025</i>	1	1	32	1	8		
<i>Serratia marcescens WX-S.marcescens001</i>	0,5	0,5	4	>16	0,25		
Название штамма и номер штамма	d5РАО	РАО	F3РАО	Линезолид	Левифлоксацин	Вориконозол	
<i>Staphylococcus aureus WX-SA007</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus WX-SA008</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus WX-SA012</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	8	-	-	
<i>Staphylococcus aureus WX-SA033</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	4	-	-	
<i>Enterococcus faecalis WX-E.faecalis002</i>	0,125	0,125	0,125	8	-	-	
<i>Enterococcus faecalis WX-E.faecalis007</i>	0,25	0,125	0,125	4	-	-	
<i>Enterococcus faecalis WX-E.faecalis007</i>	0,125	0,125	≤0,06	4	-	-	
<i>Enterococcus faecalis WX-E.faecium010</i>	0,25	0,25	0,25	4	-	-	
<i>Streptococcus pneumoniae WX-SP001</i>	0,125	0,125	0,125	1	1	-	
<i>Streptococcus pneumoniae WX-SP002</i>	0,125	0,125	0,25	1	1	-	

<i>Candida albicans</i> WX-CA007	64	64	8	-	-	0,0039	
<i>Candida albicans</i> WX-CA008	64	64	8	-	-	0,0078	
<i>Candida albicans</i> WX-CA009	64	64	8	-	-	0,5	
<i>Candida albicans</i> WX-CA011	64	64	8	-	-	0,5	
Название штамма и номер штамма	d5РАО	РАО	ФЗРАО	Ципро- флоксацин	Клинда- мицин		
<i>Neisseria gonorrhoeae ATCC 700825</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,008	-		
<i>Neisseria gonorrhoeae 35/02</i>	≤0,06	≤0,06	0,125	1	-		
<i>Neisseria gonorrhoeae FA6140</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,03	-		
<i>Neisseria gonorrhoeae FA19</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,008	-		
<i>Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226</i>	0,03	0,03	0,06	0,008	-		
<i>Clostridium tetani ATCC 454</i>	0,125	0,125	0,125	-	0,016		
<i>Clostridium tetani ATCC 10779</i>	0,125	0,125	0,125	-	0,016		
<i>Clostridium tetani ATCC BAA-1870</i>	1	1	1	-	>2		
<i>Clostridium tetani ATCC 19406</i>	0,125	0,125	0,125	-	0,016		
<i>Clostridium tetani ATCC 43255</i>	0,5	0,5	1	-	0,5		
<i>Clostridium tetani ATCC BAA-1382</i>	0,5	0,5	0,5	-	>2		
<i>Propionibacterium</i>	0,5	0,5	0,5	-	0,06		

<i>acnes</i> ATCC 6919							
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 453	0,125	0,125	0,5	-	0,016		

Результаты показали, что РАО и его дейтериевое производное d5РАО, а также фторированное производное F3РАО демонстрируют ингибирующее воздействие на разные виды протестированных штаммов, особенно на лекарственно-резистентные штаммы. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) составляла менее 8 мкг/мл, и большинство МИС находились в диапазоне 0,06-1 мкг/мл, оказывая, следовательно, ингибирующее действие широкого спектра. Из этих трех соединений РАО и дейтерированный РАО продемонстрировали сходное или более сильное ингибирующее воздействие, чем фторированный РАО.

С точки зрения ингибирующего воздействия на определенные бактерии эти соединения продемонстрировали существенные преимущества по сравнению с противомикробными средствами, которые служили положительным контролем. Например, минимальная ингибирующая концентрация МИС линезолида против *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* и *Staphylococcus aureus* составляла 2-4 мкг/мл, тогда как большинство МИС РАО и его производных против этих бактерий были меньше или равны 0,0625 мкг/мл. По сравнению с колистином эти протестированные соединения также демонстрируют значительное ингибирующее преимущество против *E. coli*. По сравнению с клиндамицином, они также показывают сильное преимущество против *Bacterioides fragilis*, *Clostridium difficile*.

Протестированные соединения РАО также демонстрируют хорошее ингибирующее воздействие против таких бактерий, как *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Cryptococcus neoformans*, *Gardnerella vaginalis*, *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, а также *Trichomonas vaginalis*, с эффектами, аналогичными эффектам контрольных противомикробных средств.

Наконец, протестированные соединения были не способны показать значительные преимущества против таких бактерий, как *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium tetani* и *Atopobium vaginae*.

В заключение, РАО и его дейтерированные и фторированные производные обладают широким спектром антипатогенных эффектов. Они оказывают лучшее ингибирующее воздействие на многие штаммы, чем клинически широко применяемые противомикробные средства.

Пример 15. Регуляция уровней глюкозы в крови/массы тела соединениями

d5PAO, PAO и F3PAO в животной модели сахарного диабета

Мыши ApoE^{-/-} являются одной из моделей для исследования развития диабета, а также его превентивного лечения. В этом эксперименте использовали взрослых самцов мышей ApoE^{-/-} в возрасте 8 недель (Saiye Bio). В качестве растворителя для PAO, d5PAO и F3PAO использовали среднепочечные жирные кислоты МСТ: PAO (0,015 мг/мл), d5PAO (0,015 мг/мл) и F3PAO (0,015 мг/мл). Мышей кормили кормом с высоким содержанием жира (Dyets, высокое содержание жиров (40 ккал%), высокий уровень холестерина (1,5%). Самцов мышей ApoE^{-/-} случайным образом разделяли на 4 группы: группа холостого контроля МСТ (МСТ, n=6), группа PAO (0,15 мг/кг/сутки, п.о., n=8), группа d5PAO (0,15 мг/кг/сутки, п.о., n=8) и группа F3PAO (0,05 мг/кг/сутки, п.о., n=7). Значительного различия в средней массе тела между этими 4-мя группами не было. После этого мышам ApoE^{-/-} в 4 группах были предоставлены одинаковые условия содержания, а также условия питания и питья. Соединения вводили мышам ApoE^{-/-} через пероральный зонд в дозе 0,2 мл с понедельника по пятницу каждую неделю и прекращали в выходные. После 12 недель кормления кормом с высоким содержанием жира и введения лекарственного средства у мышей измеряли массу тела и уровень глюкозы в крови. Для измерения уровня глюкозы в крови кровь брали из хвостовой вены мышей, клиппируя мышью рукой, и уровень глюкозы в крови измеряли и регистрировали с использованием тест-полосок для определения уровня глюкозы в крови Roche и глюкометра, и уровень представлял собой случайный уровень глюкозы в крови. После 24-часового голодания (воду получали) тот же метод был использован для анализа крови из хвостовой вены мышей, клиппированных рукой, и уровень глюкозы в крови измеряли и регистрировали с использованием тест-полосок для определения уровня глюкозы в крови Roche и глюкометра, и уровень глюкозы в крови измеряли натошак. После 24-часового голодания кормление кормом с высоким содержанием жира возобновляли равным образом, и через 2 часа брали кровь из хвостовой вены мышей, клиппированных тем же методом, и уровень глюкозы в крови измеряли и регистрировали с использованием тест-полосок для определения уровня глюкозы в крови Roche и глюкометра, и этот уровень представлял собой 2-часовой постпрандиальный уровень глюкозы в крови.

Для статистического анализа использовали программное обеспечение SPSS22.0. Данные измерений выражали в виде $x \pm s$, и для сравнения между двумя группами использовали критерий Стьюдента независимых выборок; данные подсчета выражали в виде степени (%), и для сравнения между группами использовали критерий χ^2 . $p < 0,05$ расценивался как статистическое различие.

Результаты:

1) F3PAO и d5PAO снижали массу тела тестируемых мышей ApoE^{-/-}

Как показано на Фиг. 34, средняя масса тела мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира, которым вводили F3PAO и d5PAO в течение 12 недель, была значительно ниже, чем у группы МСТ.

2) PAO снижал массу тела испытуемых мышей ApoE^{-/-}

Как показано на Фиг. 35, средняя масса тела мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира, которым вводили PAO в течение 20 недель, была значительно ниже, чем у группы МСТ.

3) PAO, F3PAO и d5PAO снижали уровни глюкозы в крови мышей ApoE^{-/-}

Как показано на Фиг. 36, после введения в течение 12 недель средний уровень глюкозы в крови натощак в группах F3PAO и d5PAO был значительно ниже, чем в группе МСТ, и средний уровень глюкозы в крови натощак в группе PAO также снизился по сравнению с группой МСТ.

Приведенные выше результаты показали, что PAO, F3PAO или d5PAO в значительной степени ингибируют прирост массы тела мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира и холестерина. PAO, d5PAO и F3PAO снижают или имеют тенденцию к снижению уровня глюкозы в крови в постпрандиальном периоде и натощак у мышей с нокаутом ApoE3, причем снижение уровня глюкозы в крови натощак при введении d5PAO и F3PAO было особенно значительным, при этом активность F3PAO в 3 раза и более выше, чем активность d5PAO. Несмотря на то, что PAO не показал статистической значимости, он также продемонстрировал тенденцию к ингибирующему воздействию на уровень глюкозы в крови натощак у мышей ApoE^{-/-}, получавших корм с высоким содержанием жира. Кроме того, имеются доказательства аналогичных воздействий этих соединений на другой животной модели диабета, на мышях Db/Db.

Пример 16. Способ количественного анализа соединений мышьяка в биологических образцах

Поскольку в биологических образцах и пробах окружающей среды все еще содержится много содержащих мышьяк соединений, возникли непреодолимые трудности при количественном анализе соединений мышьяка в этих образцах, особенно органических соединений мышьяка, таких как соединения фениларсина. Во-первых, некоторые соединения мышьяка прочно связываются с белками, в частности связываются с белками посредством ковалентных связей (например, мышьяк в соединениях образует ковалентные связи с соседней дитиогруппой в белке), что приводит, с одной стороны, к тому, что скорость экстракции низкая, и, во-вторых, при разделении органических соединений мышьяка жидкостной хроматографией полярность органических соединений

мышьяка и вмешательство большого количества неизвестных соединений мышьяка в образцах затрудняют выделение органических соединений мышьяка. Поэтому были выбраны методы дериватизации. В 2007 году Cathum et al. улучшили скорость экстракции путем дериватизации соединений мышьяка в образцах димеркаптопропанолом и использования высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для исследования. Но разрешение составляло всего 1,0-2,0 мкг/г (Cathum, 2007 #5256), Eom et al. в 2015 году немного улучшили разрешение за счет дериватизации соединений мышьяка в образцах с димеркаптотолуолом (толуол-3,4-дитихолом) и использования ВЭЖХ для исследования; разрешение вычисляли, исходя из количества мышьяка в соединениях мышьяка. Нижний предел количественного анализа составлял примерно 0,06-0,21 мкг/г (Eom, 2015 #3263).

В настоящем изобретении используется димеркаптопропансульфонат натрия ($C_nH_{(2n+1)}NaO_3S_3$) и др. для дериватизации соединений мышьяка в образцах, что значительно улучшает разрешение (см. Фиг. 37). Нижний предел количественного анализа для оксида фениларсина (РАО) может составлять всего 0,45 нг/мл при вычислении разрешения в расчете на количество мышьяка в соединениях мышьяка. Однако метод дериватизации имеет некоторые недостатки, связанные с тем, что разные соединения дают одни и те же продукты дериватизации при дериватизации; например, как РАО, так и фениларсоновая кислота (РАА) могут быть дериватизированы димеркаптопропансульфонатом натрия с получением одних и тех же продуктов дериватизации. Неожиданно оказалось, что в образцах крови димеркаптопропансульфонат натрия может дериватизировать только РАО, но не РАА. Таким образом, дериватизация димеркаптопропансульфонатом натрия позволяет обеспечить высокое и специфическое обнаружение РАО в крови.

I. Метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) для определения концентрации РАО в цельной крови с EDTA-K2

В настоящей заявке описана частичная валидация аналитического способа определения концентрации РАО в цельной крови крыс SD жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Результаты включали линейность, прецизионность и точность внутри партии и между партиями, чувствительность, специфичность, матричный эффект, надежность разведения, эффективность экстракции, остатки, пригодность системы и стабильность аналитов в обрабатываемых образцах при повторных инъекциях. Линейный диапазон способа составлял 1,00 нг/мл - 500 нг/мл при 30 мкл цельной крови крыс SD, и результаты валидации продемонстрировали, что способ надежен и пригоден для определения концентрации РАО в матрице цельной крови крыс

SD.

Показатель валидации методологии	Результаты валидации методологии	Цитируемая таблица
Описание аналитических методов	Метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС) был разработан для определения концентрации РАО в цельной крови крыс SD. Толбутамид использовали в качестве внутреннего стандарта, и был выбран экстракционный метод преципитации белков в ацетонитрильном растворе. Обращенно-фазовая хроматографическая колонка: ACQUITY UPLC® Peptide C18 130 Å 2,1x100 мм в.д., 1,7 мкм (Waters), электрораспылительная ионизация в режиме регистрации отрицательных ионов, и ионные пары были m/z 336,8→152,9 для РАО и m/z 269,0→169,8 для внутреннего стандарта.	-
Объем образца	30 мкл	-
Аналит	РАО	-
Внутренний стандарт	Толбутамид	-
Линейный диапазон	1,00-500 нг/мл	
Нижний предел количественного определения (LLOQ)	1,00 нг/мл	Таблица 14
Модель регрессии	Линейная регрессия	
Весовой коэффициент	$1/x^2$	Таблица 15
Коэффициент детерминации (CoD)	$R^2 \geq 0,9944$	
Концентрация образца QC	3,00, 80,0 и 400 нг/мл	
Диапазон точности внутри партии (отклонения, %)	-15,5%-7,8%	Таблица 16
Диапазон прецизионности	4,1%-8,3%	

внутри партии (коэффициент вариации, %)		
Диапазон точности между партиями (отклонение, %)	-5,9%-7,4%	
Диапазон прецизионности между партиями (коэффициент вариации, %)	4,6%-9,9%	
Надежность разведения	4000 нг/мл, 10-кратная надежность разведения верифицированная	Таблица 17
Специфичность	Отсутствие количественно интерферирующих пиков при временах удержания аналитов и внутренних стандартов в шести разных партиях холостых матриц цельной крови крыс SD	Таблица 18
	Отсутствие интерференции между аналитом и внутренним стандартом в холостой матрице цельной крови крыс SD	Таблица 19
Матричный эффект	Отсутствие значимого матричного эффекта в шести разных партиях цельной крови крыс SD	Таблица 20
Эффективность экстракции (общий % коэффициента вариации)	5,2%	Таблица 21
Остатки (%)	Остатки аналита и внутреннего стандарта соответствуют критериям приемлемости	Таблица 22
Стабильность аналитов в обрабатываемых образцах при повторных инъекциях	Стабильные при 10°C в течение по меньшей мере 53 часов	Таблица 23

Сокращения:

ЖХ-МС/МС	Жидкостная хроматография/тройная квадрупольная тандемная масс-спектрометрия
----------	---

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
В	вольт
эВ	электронвольт
фунт/кв. дюйм	фунты на квадратный дюйм
m/z	соотношение масс/заряд
мс	миллисекунда
ACN	ацетонитрил
MeOH	метанол
IPA	изопропанол
TFA	трифторуксусная кислота
FA	муравьиная кислота
DMSO	диметилсульфоксид
NH ₄ OAc	ацетат аммония
AR	аналитически чистые реагенты
MΩ	мегаОм
мМ	миллимоли на литр
моль/л	Моль на литр
мкм	микрометр
мкг/мл	микрограммы на миллилитр
об.	объем
нг/мл	нанogramмы на миллилитр
об/мин	Обороты в минуту
г	грамм
<i>g</i>	центробежная сила
R ²	коэффициент детерминации
MF	фактор матрицы
LLOQ	нижний предел количественного определения
ULOQ	верхний предел количественного определения

Настоящее изобретение создает аналитический способ жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) и частично обосновывает аналитический способ в соответствии с программой аналитических исследований «Методологическая валидация метода жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) для определения концентрации РАО в цельной крови крыс SD».

Стабильность аналитов в исходном растворе и в рабочем растворе, а также стабильность РАО в образцах цельной крови крыс SD в условиях влажного льда, стабильность при хранении в морозильнике при ультранизкой температуре и стабильность после 4 циклов замораживания и оттаивания могут относиться к протоколу GLP BAS в SuzhouСучжоу.

1. Экспериментальные материалы и аналитические методы

1.1 Референсные стандарты и внутренние стандарты

Информация о референсных стандартах	
Название референсного стандарта	РАО
Молекулярная формула/молекулярная масса	$C_6H_5AsO/168,03$
Калибровочный коэффициент	1,005
Источник	Kaihui Pharmaceutical Shanghai Co., Ltd.
Номер партии	SP-0020182-007
Чистота	99,5%
Условия хранения	Герметизирован, при комнатной температуре

Информация о внутренних стандартах	
Название внутреннего стандарта	Толбутамид
Молекулярная формула/молекулярная масса	$C_{12}H_{18}N_2O_3S/270.35$
Источник	Sigma
Номер партии	MKBR6717V
Чистота	99,9%
Условия хранения	Герметизирован, заморожен и сухое хранение

1.2 Реагенты

Информация о реагентах для тестирования

диметилсульфоксид / DMSO

Реагент сорта для ВЭЖХ, Sigma, Партия №

	STBH8372
ацетонитрил / ACN	Реагент сорта для ВЭЖХ, Merck, Партия № JA083330
метанол / MeOH	Реагент сорта для ВЭЖХ, Merck, Партия № I1003307913
муравьиная кислота / FA	Реагент сорта для ВЭЖХ, Honeywell Fluka, Партия № I240DIL
уксусная кислота / AA	Реагент сорта для ВЭЖХ, Sigma, Партия № SHBJ2597
изопропанол / IPA	Реагент сорта для ВЭЖХ, Sigma, Партия № WXBD0243V
трифторуксусная кислота / TFA	Реагент сорта для ВЭЖХ, Fluka, Партия № I2550IL
ацетат аммония / NH ₄ OAc	Реагент сорта для ВЭЖХ, Sigma, Партия № SLBV5241
вода, используемая при тестировании / вода	ELGA PureLabUVF+OptionS15 ($\geq 18,2\text{M}\Omega$), Shanghai WuXi AppTec собственного производства

1.3 Получение холостой матрицы

Информация о холостой матрице

Матрица	Холостая EDTA-K ₂ цельная кровь крысы SD
Поставщик	Лабораторное приготовление компанией WuXi AppTec Shanghai
Условия хранения	<-60°C

1.4 Приготовление исходного раствора

Приготовление исходного раствора PAO: два референсных стандарта в соответствующих количествах точно взвешивали, помещали во флакон из коричневого стекла и затем готовили контрольный исходный раствор в концентрации 1,00 мг/мл с использованием DMSO. Исходный раствор перемешивали на вортексе до полного растворения и хранили при -20°C в морозильнике. Одну часть использовали в качестве калибровочного стандартного исходного раствора, другую часть использовали в качестве

исходного раствора образца контроля качества (QC).

Приготовление исходного раствора толбутамида в качестве внутреннего стандарта: внутренний стандарт в соответствующем количестве точно взвешивали и помещали во флакон из коричневого стекла, и затем готовили исходный раствор внутреннего стандарта в концентрации 1,00 мг/мл с использованием DMSO. Исходный раствор перемешивали на вортексе до полного растворения и хранили при температуре -20°C в морозильнике.

Приготовление исходного раствора реагента 2,3-димеркаптопропансульфонат натрия: порошок стандартного 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия в соответствующем количестве точно взвешивали и помещали в стеклянный флакон, и затем готовили исходный раствор в концентрации 1,00 мг/мл с использованием чистой воды. Исходный раствор перемешивали на вортексе до полного растворения и хранили при комнатной температуре.

1.5 Приготовление рабочих растворов для калибровочных стандартов, образцов QC и внутренних стандартов

Рабочий раствор для калибровочных стандартов (CWS) и рабочий раствор для образцов QC (WS) готовили нижеследующим образом и хранили при температуре -20°C в морозильнике.

Примечание: Объем препарата можно корректировать в соответствии с фактическими потребностями, но конечная концентрация должна оставаться неизменной.

Исходный раствор			Рабочий раствор (растворитель:вода:ацетонитрил (об.:об., 50:50))		
Исходный раствор №	Концентрация (мкг/мл)	Объем пипетирования (мкл)	Конечный объем (мкл)	Концентрация (мкг/мл)	Рабочий раствор №
Исходный раствор калибровочного стандарта	1000	20	800	25,0	CWS-C1
Исходный раствор калибровочного стандарта	1000	22	1000	22,0	CWS-C2

Исходный раствор калибровочного стандарта	1000	12	1000	12,0	CWS-C3
CWS-C1	25,0	100	500	5,00	CWS-C4
CWS-C1	25,0	60	600	2,50	CWS-C5
CWS-C1	25,0	20	1000	0,500	CWS-C6
CWS-C4	5,00	10	500	0,100	CWS-C7
CWS-C4	5,00	10	1000	0,0500	CWS-C8
Исходный раствор образца контроля качества	1000	16	800	20,0	WS-HQC
Исходный раствор образца контроля качества	1000	4	1000	4,00	WS-MQC
WS-MQC	4,00	15	400	0,150	WS-LQC
WS-LQC	0,150	100	300	0,0500	WS-LLOQ
Исходный раствор образца контроля качества	1000	20	100	200	WS-DQC

Исходный раствор внутреннего стандарта толбутамида (1,00 мг/мл в DMSO) дополнительно разводили ацетонитрильным раствором для приготовления рабочего раствора внутреннего стандарта в концентрации 10,0 нг/мл и хранили при комнатной температуре.

1.6 Приготовление калибровочных стандартов и образцов QC

Калибровочные стандарты и образцы QC готовили в матрице цельной крови нижеследующим образом, и их необходимо было использовать до даты истечения срока стабильности.

Примечание: Объем препарата можно корректировать в соответствии с фактическими потребностями, но конечная концентрация должна оставаться неизменной.

Рабочий раствор №	Концентрация (мкг/мл)	Объем пипетирования (мкл)	Объем матрицы (мкл)	Концентрация (нг/мл)	Калибровочный стандарт/ образец QC №
CWS-C1	25,0	2	98	500	C1
CWS-C2	22,0	2	98	440	C2
CWS-C3	12,0	2	98	240	C3
CWS-C4	5,00	2	98	100	C4
CWS-C5	2,50	2	98	50,0	C5
CWS-C6	0,500	2	98	10,0	C6
CWS-C7	0,100	2	98	2,00	C7
CWS-C8	0,0500	2	98	1,00	C8
WS-HQC	20,0	2	98	400	HQC
WS-MQC	4,00	2	98	80,0	MQC
WS-LQC	0,150	2	98	3,00	LQC
WS-LLOQ	0,0500	2	98	1,00	LLOQ
WS-DQC	200	2	98	4000	DQC

1.7 Предварительная обработка образцов

Примечание: Объем образца может быть скорректирован в соответствии с фактическими потребностями, но конечная концентрация должна оставаться неизменной. Для обработки образцов можно использовать полиэтиленовые центрифужные пробирки вместо 96-луночного планшета, но для обработки калибровочных стандартов, образцов QC и образцов обязательно нужно использовать контейнер одинакового типа.

В 96-луночный планшет добавляли 30 мкл образца цельной крови, 90 мкл водного раствора 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия 1,00 мг/мл и 30 мкл 0,2% муравьиной

кислоты, хорошо смешивали и затем инкубировали в течение 15 минут при 45°C. 240 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта (10,0 нг/мл толбутамида в ацетонитрильном растворе) добавляли для осаждения белков. 96-луночный планшет встряхивали в течение 15 минут и затем центрифугировали при 4°C при 3220 g в течение 15 минут. 160 мкл надосадочной жидкости помещали в новый 96-луночный планшет, который затем центрифугировали при 4°C при 3220 g в течение 5 минут, и образцы напрямую загружали.

1.8 Экспериментальные приборы и условия

Условия жидкофазного анализа

Жидкостной хроматограф: система для ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии Waters ACQUITY

Колонка: ACQUITY UPLC® Peptide C18 130 Å 2,1x100 мм в.д., 1,7 мкм (Waters)

Подвижная фаза А: 0,01% АА и содержащая 2 ммоль/л NH₄ОAc вода:ACN (об.:об., 95: 5)

Подвижная фаза В: 0,01% АА и содержащая 2 ммоль/л NH₄ОAc вода:ACN (об.:об., 5: 95)

Градиент элюирования:

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	А (%)	В (%)
Начало	0,400	60	40
1,40	0,400	2	98
1,70	0,400	2	98
1,71	0,400	60	40
2,00	0,400	60	40

Температура колонки: 40°C

Слабый промывочный растворитель для инжектора образцов: ACN:вода (об.:об., 10: 90)

Сильный промывочный растворитель для инжектора образцов: раствор ACN:MeOH:IPA:вода (об.:об.: об.:об., 1: 1: 1: 1), содержащий 0,2% TFA

Температура инжектора образцов: 10°C

Инжектируемый объем: 4 мкл (инжектируемый объем может быть скорректирован соответствующим образом для получения хороших масс-спектральных характеристик)

Условия масс-спектрометрического анализа

Масс-спектрометр: AB SCIEX Triple Quad 6500+

Режим сканирования: мультиреактивный ионный мониторинг отрицательных ионов

Источник ионов: Turbo Spray	Режим ионизации: электрораспылительная ионизация
Распыляющий газ: 60 фунт/кв.дюйм	Дополнительный нагревающий газ: 60 фунт/кв. дюйм
Газовая завеса: 40 фунт/кв.дюйм	Аварийный газ: 10
Напряжение при распылении: -4500 В	Температура источника ионов: 500°C

Таблицы мультиреактивного мониторинга параметров

Название соединения	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Время выдержки (мс)	Потенциал декластеризации (эВ)	Энергия столкновения (эВ)
РАО (производное)	336,8	152,9	100	-80	-19
Толбутамид	269,0	169,8	100	-80	-23

1.9 Получение и обработка данных

Времена удерживания соединений и внутренних стандартов, получение хроматограмм и интеграцию хроматограмм обрабатывали с использованием программного обеспечения Analyst (Applied Biosystems, версия 1.6.3, Фостер-Сити, Калифорния, США).

Статистические данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Watson LIMS (Thermo Fisher Scientific, версия No 7.4.2, Филадельфия, Пенсильвания, США) и Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, версия 2013, Редмонд, штат Вашингтон, США).

1.10 Формула

1.10.1 Точность (отклонение, %)

$$\text{Точность } [\%] = 100 \times \frac{\text{(средняя) измеренная концентрация}}{\text{номинальная концентрация}}$$

$$\text{Отклонение } [\%] = \text{Точность} - 100$$

$$\text{Отклонение } [\%] = \left(100 \times \frac{\text{(средняя) измеренная концентрация}}{\text{номинальная концентрация}} \right) - 100$$

1.10.2 Прецизионность (коэффициент вариации, %)

Прецизионность выражена коэффициентом вариации, вычисленным по формуле:

$$\text{Коэффициент вариации [\%]} = 100 \times \frac{\text{стандартное отклонение}}{\text{среднее значение образца}}$$

$$\text{Стандартное отклонение} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{измеренное значение} - \text{среднее значение})^2}{n-1}}$$

1.10.3 Интерференция

Интерференции аналитов и внутренних стандартов в холостых матрицах вычисляли следующим образом:

$$\text{Интерференция [\%]} = 100 \times \frac{\text{площадь пика двойного холостого контроля}}{\text{(средняя) площадь пика LLOQ}}$$

1.10.4 Степень экстракционного извлечения

$$\text{Степень извлечения} = 100 \times \frac{\text{(средняя) площадь пика экстрагированного образца}}{\text{(средняя) площадь пика пробы}}$$

1.10.5 Стабильность

$$\text{Стабильность} = 100 \times \frac{\text{(средняя) измеренная концентрация}}{\text{номинальная концентрация}}$$

2. Валидация аналитического способа

Была проведена полная валидация аналитического способа определения концентрации РАО в цельной крови крыс SD с использованием толбутамида в качестве внутреннего стандарта.

Таблица 13: Схема валидации способа

Номер аналитической партии	Приемлемость или нет	Информация о тестировании аналитической партии
1	Да	Калибровочная кривая, образцы QC, специфичность, интерференция, надежность разведения (1/10), остатки, точность и прецизионность внутри партии и между партиями
2	Нет*	Калибровочная кривая, образцы QC, степень экстракционного извлечения, матричный эффект, остатки и точность и прецизионность внутри партии
3	Да	Калибровочная кривая, образцы QC, остатки и точность и прецизионность внутри партии
4	Да	Калибровочная кривая, образцы QC, степень экстракционного извлечения, матричный эффект, остатки и точность и прецизионность внутри партии

5	Нет **	Калибровочная кривая, образцы QC и стабильность обработанных образцов через 79 часов
6	Да	Калибровочная кривая, образцы QC и стабильность обработанных образцов через 23 часа
7	Да	Калибровочная кривая, образцы QC и стабильность обработанных образцов через 53 часов

* LLQC не отвечает критериям анализа

**паттерн пиков аномальный

2.1 Вычисленная концентрация калибровочных стандартов

Калибровочные стандарты должны давать концентрации в пределах $\pm 15,0\%$ от номинального значения, за исключением самого низкого калибровочного стандарта, который должен быть в пределах $\pm 20,0\%$. Вычисленные концентрации для калибровочных стандартов приведены в Таблице 14, и калибровочные стандарты для трех аналитических партий в этом испытании соответствовали вышеуказанным критериям приемлемости.

Таблица 14: Вычисленные концентрации калибровочных стандартов PAO в цельной крови крыс SD

Аналитическая партия №	1	% отклонения*	3	% отклонения *	4	% отклонения *	Среднее значение	Стандартное отклонение	% коэффициента вариации	% отклонения внутри партии	Размер образца
1,00 нг/мл	0,996	-0,4	1,01	1,0	1,01	1,0	1,01	0,00808	0,8	1,0	3
2,00 нг/мл	**1,45		1,96	-2,0	1,97	-1,5	1,97			-1,5	2
10,0 нг/мл	10,5	5,0	9,91	-0,9	9,75	-2,5	10,1	0,395	3,9	1,0	3
50,0 нг/мл	50,0	0,0	47,7	-4,6	51,0	2,0	49,6	1,69	3,4	-0,8	3
100 нг/мл	86,9	-13,1	108	8,0	105	5,0	100	11,4	11,4	0,0	3
240 нг/мл	265	10,4	237	-1,3	231	-3,8	244	18,1	7,4	1,7	3
440 нг/мл	425	-3,4	437	-0,7	457	3,9	440	16,2	3,7	0,0	3
500 нг/мл	507	1,4	503	0,6	477	-4,6	496	16,3	3,3	-0,8	3

*% отклонения должен находиться в пределах $\pm 15,0\%$, за исключением для LLOQ, который должен находиться в пределах $\pm 20,0\%$

**% отклонения превышал $\pm 15,0\%$ и поэтому не был включено в линейную подгонку

*% отклонения должен находиться в пределах $\pm 15,0\%$, за исключением для LLOQ, который должен находиться в пределах $\pm 20,0\%$

**% отклонения превышал $\pm 15,0\%$ и поэтому не был включен в линейную подгонку

2.1.1 Калибровочная кривая (линейная)

	нения (1,00 нг/мл)	трация (3,00 нг/мл)	нения	трация (80,0 нг/мл)	нения	трация (400 нг/мл)	нения	
1	0,873	-12,7	2,82	-6,0	82,6	3,3	394	-1,5
	0,907	-9,3	2,86	-4,7	84,2	5,3	460	15,0
	0,818	-18,2	3,12	4,0	90,6	13,3	445	11,3
	0,845	-15,5	3,14	4,7	83,1	3,9	406	1,5
	0,835	-16,5	2,77	-7,7	84,3	5,4	455	13,8
	#0,792	-20,8	3,42	14,0	90,0	12,5	423	5,8
Среднее значение внутри партии	0,845		3,02		85,8		431	
Стандартное отклонение внутри партии	0,0407		0,250		3,55		27,1	
% коэффициента вариации внутри партии*	4,8		8,3		4,1		6,3	
% отклонения внутри партии**	-15,5		0,7		7,3		7,8	
Размер образца	6		6		6		6	
3	1,06	6,0	2,92	-2,7	81,6	2,0	400	0,0
	1,08	8,0	3,29	9,7	82,8	3,5	444	11,0
	1,09	9,0	3,19	6,3	88,6	10,8	433	8,3
	0,921	-7,9	3,07	2,3	83,8	4,8	393	-1,8
	1,04	4,0	3,21	7,0	##92,3	15,4	411	2,8
	0,939	-6,1	3,00	0,0	87,4	9,3	408	2,0
Среднее значение внутри партии	1,02		3,11		86,1		415	
Стандартное отклонение внутри партии	0,0733		0,140		4,07		19,7	
Внутри партии коэффициент вариации, %	7,2		4,5		4,7		4,7	
Внутри партии отклонение, %	2,0		3,7		7,6		3,8	
Размер образца	6		6		6		6	

Таблица 16. (Продолжение) Прецизионность и точность РАО в цельной крови крыс SD

Аналитическая	LLOQ	%	Низкая	%	Сред-	%	Высо-	%
---------------	------	---	--------	---	-------	---	-------	---

партия №	откло нения	концент рация	откло нения	няя концент рация	откло нения	кая концен- трация	откло нения	
	(1,00 нг/мл)	(3,00 нг/мл)		(80,0 нг/мл)		(400 нг/мл)		
4	0,997	-0,3	3,00	0,0	83,8	4,8	409	2,3
	0,911	-8,9	2,92	-2,7	84,9	6,1	408	2,0
	0,906	-9,4	3,25	8,3	##95,4	19,3	407	1,8
	0,978	-2,2	3,32	10,7	83,6	4,5	##273	-31,8
	0,922	-7,8	3,24	8,0	82,8	3,5	384	-4,0
	1,03	3,0	3,19	6,3	83,8	4,8	403	0,8
Среднее значение внутри партии	0,957		3,15		85,7		381	
Стандартное отклонение внутри партии	0,0516		0,157		4,79		53,6	
% коэффициента вариации внутри партии	5,4		5,0		5,6		14,1	
% отклонения внутри партии	-4,3		5,0		7,1		-4,8	
Размер образца	6		6		6		6	
Среднее значение между партиями	0,941		3,10		85,9		409	
Стандартное отклонение между партиями	0,0922		0,186		3,92		40,4	
% коэффициента вариации между партиями ***	9,8		6,0		4,6		9,9	
% отклонения между партиями****	-5,9		3,3		7,4		2,3	
Размер образца	18		18		18		18	

* % коэффициента вариации внутри партии должен быть $\leq 15,0\%$, и LLOQ должен быть $\leq 20,0\%$

** % отклонения внутри партии должен быть в пределах $\pm 15,0\%$, и LLOQ должен быть в пределах $\pm 20,0\%$

*** % коэффициента вариации между партиями должен быть $\leq 15,0\%$, и LLOQ должен быть $\leq 20,0\%$

**** % отклонения между партиями должен быть в пределах $\pm 15,0\%$, и LLOQ должен быть в пределах $\pm 20,0\%$

% отклонения не был в пределах $\pm 20,0\%$, но данные все же были включены в вычисление

прецизионности и точности внутри партии, и все результаты отвечали аналитическим требованиям
% отклонения не был в пределах $\pm 15,0\%$, но данные все же были включены в вычисление
прецизионности и точности внутри партии, и все результаты отвечали аналитическим требованиям

2.2 Нижний предел количественного определения и верхний предел количественного определения (LLOQ и ULOQ)

Для всех трех партий средняя точность LLOQ была в пределах $\pm 20,0\%$, и средняя прецизионность LLOQ была менее $20,0\%$; средняя точность ULOQ была в пределах $\pm 15,0\%$, и средняя прецизионность ULOQ была менее $15,0\%$.

2.3 Надежность разведения

Тест на разведение был использован для верификации надежности разведения разведенных образцов в концентрациях выше ULOQ.

Для верификации надежности разведения готовили контрольные образцы в концентрации 4000 нг/мл , и их разводили 10-кратно холостой цельной кровью крыс SD в шести повторах.

Средняя точность (% отклонения) и прецизионность (% коэффициента вариации) приведены в Таблице 17. Результаты этого теста отвечали критериям приемлемости, и надежность 10-кратного разведения была верифицирована при разведении образцов в концентрациях выше ULOQ.

Таблица 17. Прецизионность и точность разведенных образцов QC PAO в цельной крови крыс SD

Данные анализа	Кратность разведения	Концентрация 4000 нг/мл	% отклонения
-	10	4150	3,8
		4600	15,0
		4320	8,0
		4250	6,3
		4210	5,3
		5430	35,8
Среднее значение внутри партии		4490	
Стандартное отклонение внутри партии		485	
% коэффициента вариации внутри партии *		10,8	
% отклонения внутри партии **		12,3	

					е				
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 1	0	4900	0,0	Да	0	882000	0,0	Да	
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 2	0	4950	0,0	Да	0	901000	0,0	Да	
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 3	0	5520	0,0	Да	0	877000	0,0	Да	
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 4	0	5470	0,0	Да	0	882000	0,0	Да	
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 5	0	4970	0,0	Да	0	894000	0,0	Да	
Крысиная кровь с EDTA-K2, источник 6	0	4360	0,0	Да	0	908000	0,0	Да	
Среднее		5030			Среднее	891000			

* % интерференционной составляющей аналита в холостой матрице должен быть менее 20,0% от ответа аналита в LLOQ образце

** % интерференционной составляющей внутреннего стандарта в холостой матрице должен быть менее 5,0% от ответа внутреннего стандарта в LLOQ образце

Крысиная кровь с EDTA-K2, источники 1-6: Холостая цельная кровь крыс SD, не содержащая PAO или толбутамид, из шести разных источников

Таблица 19. Оценка интерференции аналитов и внутренних стандартов в холостой цельной крови крыс SD

Наименование образца	РАО (аналит)				Наименование образца	Толбутамид (внутренний стандарт)			
	Пло- щадь пика в холостой матрице	Пло- щадь пика в LLOQ образце	% интер- фере- нции*	<20,0 % Да/ Нет		Пло- щадь пика в холосто й матрице	Пло- щадь пика в LLOQ образце	% интер- ферен- ции **	<5,0% Да/ Нет
Интерференция QC0-1	0	6790	0,0	Да	Интерференция ULOQ-1	0	899000	0,0	Да
Интерференция QC0-2	0		0,0	Да	Интерференция ULOQ-2	0		0,0	Да
Интерференция QC0-3	0		0,0	Да	Интерференция ULOQ-3	0		0,0	Да

		стандарт)		стандарт)		стандарту)	стандарту)
Низкая:	Референ- 9860	1020000	-	-	-	4,8	7,2
	сная (среднее значение)						
2,00 нг/мл	Крысиная20700	1060000	2,10	1,04	2,02		
	кровь с EDTA-K2 источник 1						
	Крысиная18200	999000	1,85	0,979	1,89		
	кровь с EDTA-K2 источник 2						
	Крысиная17900	996000	1,82	0,976	1,86		
	кровь с EDTA-K2 источник 3						
	Крысиная18000	1040000	1,83	1,02	1,79		
	кровь с EDTA-K2 источник 4						
	Крысиная18000	1040000	1,83	1,02	1,79		
	кровь с EDTA-K2 источник 5						
	Крысиная19000	1010000	1,93	0,990	1,95		
	кровь с EDTA-K2 источник 6						
Высокая:	Референ- 2600000	997000	-	-	-	5,3	
	сная (среднее значение)						
500 нг/мл	Крысиная4820000	1030000	1,85	1,03	1,80		
	кровь с						

EDTA-K2				
источник				
1				
Крысиная43400001020000	1,67	1,02	1,64	
кровь с				
EDTA-K2				
источник				
2				
Крысиная4630000979000	1,78	0,982	1,81	
кровь с				
EDTA-K2				
источник				
3				
Крысиная3990000966000	1,53	0,969	1,58	
кровь с				
EDTA-K2				
источник				
4				
Крысиная4200000966000	1,62	0,969	1,67	
кровь с				
EDTA-K2				
источник				
5				
Крысиная4360000986000	1,68	0,989	1,70	
кровь с				
EDTA-K2				
источник				
6				

* % коэффициента вариации должен быть $\leq 15,0\%$

Крысиная кровь с EDTA-K2, источники 1-6: холостая цельная кровь крыс SD из шести разных источников

2.6 Степени извлечения для процессов обработки биологических образцов

Степень экстракционного извлечения аналита из биологических образцов вычисляли путем деления площадей пиков аналитов, полученных для трех уровней концентрации PAO, экстрагированного из биологических образцов (3,00, 80,0 и 400 нг/мл, по три повтора каждого уровня концентрации) соответственно на площади пиков аналитов, полученных для контрольного раствора PAO такой же концентрации, приготовленного с использованием надосадочной жидкости после экстракции из холостой матрицы. Формула представлена в Разделе 1.10.4.

Общий % коэффициента вариации для извлечения аналита PAO в матрице,

подлежащей тестированию в условиях существующих методов обработки биологических образцов, составлял 5,2%. Результаты показали отсутствие значимого различия в извлечениях при низких, средних и высоких концентрациях, результаты представлены в Таблице 21.

Таблица 21. Извлечение РАО при обработке цельной крови крыс SD

Наименование образца	Площадь пика контроля	Наименование образца	Площадь пика экстракта	Степень извлечения (%)	% коэффициента вариации*	Общий % коэффициента вариации для извлечения при всех концентрациях *
Извлечение LQC 1	16200	Экстракция LQC 1	11200	67,1	5,8	
Извлечение LQC 2	17100	Экстракция LQC 2	12000	71,9		
Извлечение LQC 3	16900	Экстракция LQC 3	12600	75,4		
Среднее значение	16700	Среднее значение	11900			
Стандартное отклонение	473	Стандартное отклонение	702			
% коэффициента вариации	2,8	% коэффициента вариации	5,9			
Извлечение MQC 1	404000	Экстракция MQC 1	298000	71,0	2,7	5,2
Извлечение MQC 2	428000	Экстракция MQC 2	303000	72,1		
Извлечение MQC 3	429000	Экстракция MQC 3	314000	74,8		
Среднее значение	420000	Среднее значение	305000			
Стандартное отклонение	14200	Стандартное отклонение	8190			
% коэффициента вариации	3,4	% коэффициента вариации	2,7			
Извлечение HQC 1	1920000	Экстракция	1540000	78,2	0,6	

		HQC 1	
Извлечение HQC 2	2020000	Экстракция HQC 2	1530000 77,7
Извлечение HQC 3	1980000	Экстракция HQC 3	1550000 78,7
Среднее значение	1970000	Среднее значение	1540000
Стандартное отклонение	50300	Стандартное отклонение	10000
% коэффициента вариации	2,6	% коэффициента вариации	0,6

*% коэффициента вариации должен быть $\leq 15,0\%$

Извлечение QC: рабочий раствор PAO добавляли после экстракции холостой матрицы

Экстракция QC: рабочий раствор PAO добавляли к холостой матрице до экстракции

2.7 Остаток

Системные остатки верифицировали путем ввода холостого образца сразу после ULOQ образца. Площади пиков PAO в образцах остатков все находились в пределах 20,0% от средней площади пика в LLOQ; площади пиков внутреннего стандарта в образцах остатков все находились в пределах 5,0% от средней площади пика в LLOQ. Результаты приведены в Таблице 22, и остатки в этом аналитическом способе соответствовали стандарту.

Таблица 22. Оценка остатков PAO и толбутамида в цельной крови крыс SD

Аналитическая партия №	Наименование образца	PAO (аналит)		Толбутамид (внутренний стандарт)	
		Площадь пика	% остатка*	Площадь пика	% остатка*
1	C8	6790	-	899000	-
	Двойной холостой контроль (после C1)	0	0,0	0	0,0
3	C8	8600	-	986000	-
	Двойной холостой контроль (после C1)	0	0,0	0	0,0
4	C8	10000	-	1000000	-

Двойной холостой				
контроль (после С1)	0	0,0	0	0,0

*% остатков аналита должен составлять менее 20,0% от площади пика аналита в LLOQ образце

**% остатков внутреннего стандарта должен составлять менее 5,0% от площади пика внутреннего стандарта в LLOQ образце

2.8 Применимость системы

Хроматографическое поведение и масс-спектральный ответ аналитов были подтверждены образцами в трех LLOQ концентрациях перед исследованием образцов для валидации способа.

3. Стабильность

Все тесты на стабильность оценивали с использованием низких и высоких уровней концентрации с использованием трех образцов на каждом уровне концентрации. Критерием приемлемости являлось то, что % отклонения отношения измеренной концентрации к номинальной концентрации должен находиться в пределах $\pm 15,0\%$.

Формула представлена в Разделе 1.10.5.

3.1 Стабильность РАО в обработанных образцах при повторных инъекциях (автосамплер)

Обработанные образцы для калибровочной кривой РАО и образцы QC помещали в 96-луночные планшеты в автосамплере на 23 и 53 часа при 10°C. Затем образцы калибровочной кривой и образцы QC повторно инжестировали и анализировали существующим методом ЖХ-МС/МС, и стабильность обработанных образцов QC в автосамплере при повторных инъекциях оценивали по отношению средней концентрации аналитов к номинальной концентрации. Результаты представлены в Таблице 23, и обработанные образцы были стабильны в течение по меньшей мере 53 часов, когда были помещены в автосамплер с температурой 10°C.

Таблица 23. Стабильность повторных инъекций РАО в цельной крови крыс SD

Наименование образца	Номиналь- ная концент- рация (нг/мл в цельной крови)	Измеренная концентрация (нг/мл в цельной крови)			Сред- нее значение	Стан- дартное отклонение	% коэффи- циента вариации*	% отклонения от номинальной концент- рации**
		Повтор	Повтор	Повтор				
		1	2	3				
Низкая								

концентрация								
Нахождение при 10°C в течение 23 часов	3,00	3,19	2,96	2,90	3,02	0,153	5,1	0,7
Нахождение при 10°C в течение 53 часов	3,00	2,84	2,84	2,91	2,86	0,0404	1,4	-4,7
Высокая концентрация								
Нахождение при 10°C в течение 23 часов	400	367	362	367	365	2,89	0,8	-8,8
Нахождение при 10°C в течение 53 часов	400	370	377	380	376	5,13	1,4	-6,0

*% коэффициента вариации должен быть $\leq 15,0\%$

**% отклонения от номинальной концентрации должен находиться в пределах $\pm 15,0\%$

4. Заключение

ЖХ-МС/МС способ количественного определения PAO в цельной крови крыс SD успешно прошел валидацию. Линейный диапазон метода составил 1,00-500 нг/мл, и образцы выше ULOQ можно было разводить вплоть до 10-кратно в холостой цельной крови крыс SD. Аналитический способ прошел валидацию по калибровочной кривой, прецизионности и точности внутри партии и между партиями, чувствительности, специфичности, матричного эффекта, экстракционного извлечения, надежности разведения и остатка. Также была исследована стабильность обработанных образцов.

1) Результаты валидации способа количественного определения PAO в цельной крови крыс SD соответствовали всем критериям аналитической приемлемости. Результаты показали, что прошедший валидацию ЖХ-МС/МС способ может быть использован для определения концентрации PAO в матрице цельной крови крыс SD.

2) LLOQ PAO в цельной крови крыс SD может достигать 1,00 нг/мл, прецизионность и точность LLOQ внутри партии и между партиями отвечает критериям приемлемости.

3) Калибровочная кривая PAO в цельной крови крыс SD показала хорошую линейность ($R^2 \geq 0,9944$) и точность. Линейный диапазон составил 1,00-500 нг/мл.

4) Аналитические результаты внутри партии и между партиями образцов с четырьмя разными уровнями концентрации (n=6) отвечают критериям приемлемости, и

аналитический способ имеет хорошие прецизионность и точность внутри партии и между партиями.

5) Специфичность аналитического способа была верифицирована на отсутствие потенциальной эндогенной интерференции PAO в шести разных источниках исследованных холостых матриц. Отсутствовала также количественная интерференция между аналитами и внутренними стандартами.

6) PAO не демонстрировал значимые матричные эффекты в шести разных источниках исследованных холостых матрицах.

7) Общий % коэффициента вариации для экстракционных извлечений PAO в исследованных матрицах доступными аналитическими способами при различных концентрациях составлял 5,2%.

8) В условиях существующего аналитического способа ЖХ-МС/МС остаток PAO в цельной крови крыс SD составил менее 20% LLOQ; остаток внутреннего стандарта составил менее 5% LLOQ.

9) Результаты тестов на стабильность были следующие: PAO из обработанных образцов цельной крови крыс SD был стабилен в автосамплере при 10°C в течение по меньшей мере 53 часов.

В заключение, прошедший валидацию в настоящее время аналитический способ ЖХ-МС/МС пригоден для определения концентрации PAO в цельной крови крыс SD.

II. Влияние фениларсоновой кислоты на метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) для определения концентрации PAO в цельной крови с EDTA-K2

Этот пример показал, что фениларсоновая кислота в крови не может быть дериватизирована димеркаптопропансульфонатом натрия, или количество продукта-производного фениларсоновой кислоты на четыре порядка меньше, чем количество продукта-производного такого же количества PAO (см. Фиг. 38 и Фиг. 39).

Пример 17. Характеристики распределения PAO в тканях у крыс SD после однократного введения через пероральный зонд

В этом эксперименте 30 крыс SD были разделены на 5 групп (3/пол/группа). Каждой группе вводили однократно через пероральный зонд 0,9 мг/кг PAO в растворителе MIGLYOL® 812N. Крыс в группах 1-5 умерщвляли ингаляцией углекислого газа через 2, 4, 10, 24 и 36 часов после введения PAO. Собирали цельную кровь, а также различные ткани и получали образцы гомогенатов тканей и анализировали их прошедшим валидацию способом ЖХ/МС/МС.

Результаты показали, что после однократного введения 0,9 мг/кг PAO крысам SD

РАО быстро распределялся в тканях, достигая большей части тканей в течение 2 ч после введения (Фиг. 40).

Во всех тканях как самцов, так и самок крыс максимальная концентрация РАО достигалась между 2 и 24 часами после введения, и значительное снижение концентрации наблюдалось через 36 ч после введения.

Таблица 24. Концентрация РАО (нг/г) в различных органах самцов крыс через 2 ч после однократного введения

Животное №	Печень	Почка	Легкое	Сердце	Скелетная мышца	Селезенка
R1	13,3	33,2	12,8	12,5	48	57
R2	15,1	37,4	31,5	12,1	10,9	75
R3	18,6	86,5	58,5	18,9	5,55	100
среднее значение	15,7	52,4	34,3	14,5	21,5	77,3
стандартная ошибка	1,6	17,1	13,3	2,2	13,4	12,5
коэффициент вариации (%)	17,2	56,5	67,1	26,3	107	27,9

Таблица 25. Концентрация РАО (нг/г) в различных органах самцов крыс через 24 ч после однократного введения

Животное №	Печень	Почка	Легкое	Сердце	Скелетная мышца	Селезенка
R19	21,6	188	103	44,2	45,9	305
R20	18	199	114	45,8	54	260
R21	23	170	103	52	44,8	229
среднее значение	20,9	186	107	47,3	48,2	265
стандартная ошибка	1,5	8,5	3,7	2,4	2,9	22,1
коэффициент вариации (%)	12,3	7,85	5,93	8,71	10,4	14,4

Пример 18. РАО ингибирует образование атеросклеротических бляшек у мышей ApoE^{-/-} - новая терапевтическая схема для атеросклероза

В настоящем эксперименте тестировали воздействие ингибитора PI4KIIIa РАО на массу тела и образование внутриартериальных бляшек у мышей ApoE^{-/-}, модели атеросклероза, индуцированного диетой с высоким содержанием жира.

Мышей ApoE^{-/-} обычно используют в качестве мышинной модели атеросклероза, и развитие у них атеросклеротических поражений аналогично тому, которое наблюдается при патологоанатомических исследованиях заболеваний человека. PAO ингибировал прирост массы тела, вызванный диетой с высоким содержанием жира, а также количество и площадь внутриаортальных атероматозных бляшек у мышей ApoE^{-/-}. Эти результаты свидетельствуют о том, что PAO уменьшает образование атеросклеротических бляшек и, таким образом, становится потенциально эффективным терапевтическим вариантом против атеросклероза.

1. Экспериментальные методы

1.1 Лабораторное животное

Мышей ApoE^{-/-} (приобретенных у Suzhou Saiye Biologicals), SPF класс, в возрасте 8 недель, масса тела (20±2) г, размещали в Центре лабораторных животных госпиталя Синьхуа Школы медицины Шанхайского университета Цзяотун. Животных содержали в условиях 12 часов освещения и 12 часов темноты при постоянной температуре 22°C. Модельная группа: 7 8-недельных самцов мышей ApoE^{-/-} кормили кормом с высоким содержанием жира (корм для мышей Dyets ASHF3 с высоким содержанием жира (40% ккал%) и высоким содержанием холестерина (1,25%)). Группа PAO: 7 8-недельных самцов мышей ApoE^{-/-} кормили кормом с высоким содержанием жира (корм для мышей Dyets ASHF3 с высоким содержанием жира (40% ккал%) и высоким содержанием холестерина (1,25%)) и вводили им 0,15 мг/кг PAO через пероральный зонд один раз в день. Обе группы мышей получали корм в общей сложности 20 недель.

1.1.1 Окрашивание артерий мышей красителем масляный красный O

Приготовление растворов для окрашивания красителем масляный красный O

(1) Приготовление исходного раствора красителя масляный красный O (Oil Red O): 5 г реагента Oil Red O (Sigma, номер по каталогу SLBG0158V) разбавляли изопропиловым спиртом до 1000 мл. Oil Red O растворяли легким встряхиванием на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтровальную бумагу.

(2) Приготовление рабочего раствора красителя масляный красный O: исходный раствор красителя масляный красный O смешивали с дистиллированной водой в соотношении 6:4, и затем остатки удаляли и использовали.

(3) Приготовление 60%-ного раствора изопропанола: для приготовления раствора использовали дистиллированную воду, свежеприготовленную.

Вскрытие и взятие образцов аорты мыши

(1) Фиксация и перфузия сердца мыши:

1. Мышей анестезировали и сразу же фиксировали на пенопластовой пластине

иглой. Кожу грудной клетки зажимали щипцами, и кожу и ребра грудной полости разрезали ножницами, чтобы полностью обнажить сердце.

2. В левый желудочек мыши вводили иглу, и правое предсердие мыши разрезали, чтобы позволить крови вытекать наружу. Выполняли перфузию мышей 0,9%-ным раствором хлорида натрия в течение примерно 10 минут, в результате чего печень и язык побелели.

3. После того, как конечности, печень и язык побелели, мышей фиксировали 4%-ным параформальдегидом и выполняли перфузию 4%-ным параформальдегидом в течение 20 минут.

4. По окончании перфузии иглу извлекали, и мышей помещали на лед для последующих операций.

(2) Иссечение аорты у мышей: под микроскопом для осмотра тела брюшную и грудную полости мышей вскрывали ножницами с тупыми концами, чтобы освободить дугу аорты. Диафрагму и почки разрезали, и жир, находящийся на поверхности аорты, удаляли. Проксимальный отдел аорты приподнимали щипцами, и аорту отделяли вдоль позвоночника до ветви подвздошной артерии. Пружинные микроножницы вводили в просвет аорты и разрезали ее вдоль по внутренней кривизне дуги аорты до бифуркации подвздошных артерий, правую и левую подвздошные артерии разрезали продольно, дугу аорты, безымянную артерию, левую общую сонную артерию, левую подключичную артерию и, наконец, правую и левую подвздошные артерии отрезали от наружной кривизны дуги аорты, и всю аорту иссекали.

(3) Окрашивание красителем масляный красный О: иссеченную аорту промывали 0,9%-ным физиологическим раствором и переносили в центрифужную пробирку объемом 5 мл, предварительно заполненную 4%-ным параформальдегидом, и фиксировали в течение 12 часов при комнатной температуре. По окончании фиксации аорту 3 раза промывали физиологическим раствором и помещали в чашку Петри. Периартериальную соединительную ткань и жир тщательно отделяли под стереомикроскопом. Затем аорту погружали в рабочий раствор красителя масляный красный О и окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре. После окрашивания аорту обесцвечивали промыванием 60%-ным раствором изопропилового спирта в течение 30 секунд с последующими 3 промывками физиологическим раствором.

(4) Фотографирование и измерение площади аортальной бляшки: после окрашивания аорту раскладывали на пластиковой пластине на черном фоне, а затем фотографировали. Площадь поверхности всей артерии и площадь атеросклеротических поражений вычисляли с использованием программы Image pro plus 6.0.

1.2 Статистический анализ

Данные анализировали с использованием SPSS 23.0, измерения выражали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, и массу тела мышей и площадь, занимаемую атеросклеротическими бляшками, анализировали с использованием критерия Стьюдента; $P < 0,05$ указывал на статистическое различие.

2. Результаты

Модельная группа: 8-недельные самцы мышей ApoE^{-/-} получали корм с высоким содержанием жира (корм для мышей Dyets ASHF3 с высоким содержанием жира (40% ккал%) и высоким содержанием холестерина (1,25%). Группа PAO: 8-недельным самцам мышей ApoE^{-/-} одновременно вводили 0,15 мг/кг PAO через пероральный зонд один раз в сутки. Обе группы мышей кормили в общей сложности 20 недель. В конце кормления осуществляли транскардиальную перфузионную фиксацию под анестезией с последующим высвобождением полноразмерной аорты мышей под микроскопом для осмотра тела, которую после этого отсекали и помещали в 4%-ный раствор параформальдегида для фиксации в течение 12 часов. Периартериальную соединительную ткань удаляли после промывания физиологическим раствором и затем окрашивали красителем масляный красный O. Результаты показали, что в аорте животных модельной группы образовалось большое количество атероматозных бляшек. Напротив, количество атеросклеротических бляшек в группе PAO было значительно меньше, чем в модельной группе, а площадь бляшек во всей артерии также была меньше, чем в модельной группе (Фиг. 41); $P < 0,05$ указывал на статистическое различие (Фиг. 42).

Пример 19. Оценка эффективности PAO в овалбумин OVA-индуцированной модели астмы у мышей BALB/c

1. Экспериментальные методы и материалы

1.1 Обработка лабораторных животных

В общей сложности 40 самок мышей BALB/c были приобретены у Shanghai Jihui Laboratory Animal Breeding Co., Ltd. или у других квалифицированных поставщиков (включая 5 резервных мышей, причем резервных мышей использовали только для скрининга соответствующего диапазона массы тела животных, предназначенных для распределения по группам случайным образом, без моделирования или введения лекарственных средств, и для умерщвления в конце эксперимента). У всех животных отсутствовали специфические патогены, и им было приблизительно 5-6 недель, когда их доставили в помещение для животных PharmaLegacy. Протоколы экспериментов, предназначенных для применения к животным, одобрены IACUC (Комитет по уходу за экспериментальными животными и их использованию) PharmaLegacy.

Животных случайным образом распределяли по группам лечения исходя из их массы тела, используя функции случайного распределения BioBook. 35 животных были случайным образом разделены по 4 группам: группа G1, т.е. нормальная группа, 5 мышей BALB/c; группа G2, т.е. модельная группа, 10 мышей BALB/c; группа G3, т.е. модельная обработка + группа PAO 0,1 мг/кг массы тела; и группа G4, т.е. модельная обработка + группа PAO 0,3 мг/кг массы тела.

Приготовление сенсibilизирующего раствора: 2 мг овальбумина растворяли в 5 мл фосфатного буфера. Конечная концентрация составляла 0,4 мг/мл. Раствор 1:1 готовили путем смешивания 5 мл раствора овальбумина и 5 мл гидроксида алюминия (40 мг/мл) при температуре 37°C и помещали на горизонтальный шейкер на 30 мин для встряхивания и смешивания. Приготовление атакующего раствора: 0,5 г овальбумина растворяли в 50 мл фосфатного буфера. Конечная концентрация составляла 10 мг/мл.

В День 1 и День 14 мышей в группах G2-G4 сенсibilизировали интраперитонеальной инъекцией сенсibilизирующего раствора (0,1 мл/мышь); мышам группы G1 интраперитонеально вводили 0,1 мл фосфатного буфера. В Дни 28-31 мышей в группах G2-G4 атаквали атакующим раствором (1%-ный атакующий раствор OVA, аэрозольная дозирующая система BUXCO, 30 мин). Животных группы G1 атаквали фосфатным буфером в течение 30 мин.

1.2 Мониторинг реактивности дыхательных путей - индекс Penh

В День 32 через 4 часа после введения животных тестировали на гиперреактивность дыхательных путей с использованием плетизмографии всего тела WBP (Buxco BFL0100 WBP). Всем животным вводили небулайзером для вдыхания ацетилметахолин в увеличивающихся концентрациях 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25 и 50 мг/мл, и при соответствующих концентрациях определяли увеличение значений интервала выдоха.

В день 32 после WBP животных после анестезии трахеально интубировали с использованием 25-50 мг/кг сутента и 5-10 мг/кг мефенотиазина, и легкие промывали первый раз 0,4 мл PBS (содержащего 1% FBS). Во второй и третий раз легкие промывали еще 0,4 мл PBS (содержащего 1% FBS). Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) из трех промывок помещали на лед. BALF центрифугировали в течение 5 мин при 300 g при 4°C, и не содержащую клетки надосадочную жидкость BALF собирали и хранили при -80°C.

Общее количество лейкоцитов: 100 мкл раствора трипанового синего добавляли к 100 мкл содержащего клетки раствора BALF, и 10 мкл смеси добавляли в планшет для подсчета клеток. Общее количество клеток в четырех больших квадратах подсчитывали

под микроскопом. Общее количество клеток (клеток/мл) = абсолютное количество \times 100 мкл/общий объем BALF (мл).

Дифференциальный подсчет клеток: предметные стекла протирали спиртом. 100 мкл содержащего клетки BALF вносили в центробежную установку для нанесения покрытия. После центрифугирования клетки на предметном стекле оставляли высыхать естественным путем и затем фиксировали в метаноле в течение 1 минуты. Клетки окрашивали с использованием раствора для окрашивания по методу Райта-Гимзы с целью различения эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов. Клетки находились под микроскопом с 4-кратным полем зрения и 20-кратным увеличением. Под микроскопом подсчитывали количество дифференцированных клеток до тех пор, пока счет не составлял 200 клеток в случайно выбранной области с равномерным распределением клеток. Количество клеток = абсолютное количество/200 \times общее количество клеток (клеток/мл).

После умерщвления животных смещением шейных позвонков ткань правого легкого собирали и замораживали при -80°C после быстрого замораживания жидким азотом. Ткань левого легкого собирали, фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формальдегида, заделывали в восковой блок с использованием парафинового воска, и один срез делали продольно вдоль наибольшего среза для окрашивания H&E, и патолог оценивал диаметр дыхательных путей, толщину слизистой оболочки и воспалительный инфильтрат.

1.3 Масса тела

Животных взвешивали и регистрировали два раза в неделю на протяжении всего цикла эксперимента.

1.4 Статистический анализ

Экспериментальные данные выражали в виде среднего значения \pm стандартная ошибка (среднее \pm S.E.M.). Данные анализировали с использованием SPSS или Graphpad Prism. Конкретные использованные методы анализа описаны в условных обозначениях к фигурам и в примечаниях под таблицами. $p < 0,05$ считали статистическим различием.

2. Результаты

2.1 Анализ массы тела экспериментальных животных

Статистически анализировали массу тела мышей в каждой группе в День 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 29 и 32 эксперимента. Результаты эксперимента показали, что масса тела мышей в каждой группе увеличивалась постепенно с увеличением продолжительности эксперимента. В День 32 эксперимента не было выявлено значимого различия в массе тела мышей нормальной группы G1, группы G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и

группы G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела по сравнению с массой тела мышей группы G2; наблюдалась тенденция к снижению массы тела мышей модельной группы G2 по сравнению с нормальной группой G1, а в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела не наблюдалась существенной тенденции к снижению (Фиг. 43).

2.2 PAO улучшает дыхательную функцию у мышей модельной группы

В День 32 эксперимента через 4 часа после введения животных тестировали на гиперреактивность дыхательных путей с использованием плетизмографии всего тела WBP (Вухсо BFL0100 WBP). Всем животным вводили небулайзером для вдыхания ацетилметахолин в увеличивающихся концентрациях 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 мг/мл, и при соответствующих концентрациях определяли повышение значений интервала выдоха. По сравнению с нормальной группой G1 индекс $Penh$ и статистика площади под кривой (AUC) были значительно выше в модельной группе G2, что свидетельствует о том, что повышенные значения интервала выдоха были значительно выше, и дыхательная функция была снижена у мышей модельной группы. По сравнению с модельной группой G2 индекс $Penh$ и статистические значения AUC в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела показали тенденцию к снижению (Фиг. 44), что свидетельствует о том, что PAO в определенной концентрации может улучшать дыхательную функцию мышей в модельной группе.

2.3 PAO снижает количество множества типов лейкоцитов в жидкости лаважа легких мыши

В День 32 эксперимента легкие мышей трижды промывали с использованием PBS, подсчитывали и анализировали соответственно общее количество лейкоцитов и клетки класса лейкоцитов в жидкости лаважа. Результаты эксперимента показали, что общее количество лейкоцитов в модельной группе G2 значительно увеличилось по сравнению с общим количеством лейкоцитов в нормальной группе G1; общее количество лейкоцитов в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и в группе G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела значительно снизилось по сравнению с модельной группой G2 (Фиг. 45), что свидетельствует о том, что введение PAO в дозе 0,1 мг/кг массы тела и 0,3 мг/кг массы тела способно значительно ингибировать рост общего количества лейкоцитов в жидкостях лаважа, вызванный моделированием. Статистический анализ различных типов лейкоцитов в жидкости лаважа показал, что количество эозинофилов (EOS), макрофагов (Mac), нейтрофилов (Neu) и лимфоцитов (Lym) значительно увеличилось в модельной группе G2 по сравнению с нормальной группой G1; по сравнению с модельной группой G2 количество эозинофилов значительно снизилось в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг

массы тела и группе G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела, количество нейтрофилов значительно снизилось в группе G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела, и количество лимфоцитов имело тенденцию к снижению в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела (Фиг. 46).

2.4 PAO снижает респираторную патологию, вызванную моделированием

После умерщвления и обработки мышей собирали ткани правого легкого, замораживали их в жидком азоте и замораживали при -80°C . Собирали ткань левого легкого, фиксировали ее в 10%-ном нейтральном растворе формальдегида, заделывали в восковый блок с использованием парафинового воска и делали один срез продольно вдоль наибольшего участка для окрашивания Н&Е, и патолог оценивал диаметр дыхательных путей, толщину слизистой оболочки и воспалительную инфильтрацию.

Результаты показали, что оценка толщины слизистой оболочки, оценка воспалительной инфильтрации и оценка патологии были значительно выше в модельной группе G2 по сравнению с нормальной группой G1; по сравнению с модельной группой G2 оценка толщины слизистой оболочки в группе G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела и оценка патологии в группе G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела были значительно ниже, и оценка воспалительного процесса имела тенденцию к снижению в группе G3 модель + PAO 0,1 мг/кг массы тела и G4 модель + PAO 0,3 мг/кг массы тела (Фиг. 47).

Пример 20. Исследование терапевтических эффектов PAO и d5PAO при неалкогольном стеатогепатите

1. Экспериментальные методы

1.1 Культивирование и обработка клеток HepG2

Клетки гепатомы человека HepG2 культивировали с использованием среды DMEM, содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки (FBS), при 37°C , 5% CO_2 , влажности насыщения в инкубаторе и культивировали в течение 24 часов для обеспечения адгезии к стенке. На следующий день добавляли 0,5 мМ олеиновой кислоты (OA) и затем инкубировали в течение 24 ч в соответствии с потребностями эксперимента. После моделирующей обработки в течение 24 часов клетки обрабатывали PAO, d5PAO или f3PAO в разных концентрациях в течение 24 часов в соответствии с экспериментальным распределением по группам.

1.2 Окрашивание красителем Oil Red O

1.2.1 Приготовление окрашивающего раствора

а) Приготовление окрашивающего раствора красителем масляный красный O (Oil Red O)

Состав исходного раствора Oil Red O: 100%-ный изопропиловый спирт 100 мл +

0,5 г сухого порошка Oil Red O, полностью растворяли, фильтровали и хранили при температуре 4°C вдали от света.

Приготовление рабочего раствора Oil Red O: Перед экспериментом исходный раствор разбавляли дистиллированной водой в соотношении 3:2, фильтровали с использованием фильтровальной бумаги или мембранного шприцевого фильтра объемом 1 мл для фильтрации полярных жидкостей. Рабочий раствор был бордового цвета без осадка. Рабочий раствор использовали сразу после приготовления во избежание выпадения осадка в рабочем растворе.

b) Приготовление 60%-ного изопропанола

Состав 60%-ного изопропанола: 60 мл 100%-ного изопропанола + 40 мл дистиллированной воды, хранили при 4°C.

1.2.2 Окрашивание

a) Клеточный культуральный раствор медленно аспирировали, и клетки промывали однократно PBS;

b) клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом (P0099) или 10%-ным раствором формальдегида в течение 10 минут и дважды промывали PBS;

c) клетки покрывали соответствующим количеством промывочного раствора для окрашивания в течение 20 секунд;

d) промывочный раствор для окрашивания аспирировали, добавляли соответствующее количество окрашивающего рабочего раствора красителя масляный красный O, и клетки окрашивали в течение 10-20 минут;

e) окрашивающий рабочий раствор красителя масляный красный O удаляли; добавляли соответствующее количество промывочного раствора для окрашивания; клетки оставляли стоять в течение 30 секунд, затем промывочный раствор для окрашивания удаляли, и клетки промывали PBS в течение 20 секунд;

f) клетки равномерно покрывали соответствующим количеством PBS и затем наблюдали и фотографировали под микроскопом.

2. Результаты

Воздействие соединений PAO, d5PAO и f3PAO на модель обработанных олеиновой кислотой клеток HepG2 изучали путем окрашивания красителем масляный красный O и определения концентрации триглицеридов в клетках. Результаты показали, что PAO, d5PAO и f3PAO способны уменьшать накопление липидных капель в клетках HepG2, вызванное обработкой 0,5 мМ олеиновой кислотой (Фиг. 48А). Обработка 0,5 мМ олеиновой кислотой приводила к значительному увеличению количества триглицеридов в клетках по сравнению с контролем, тогда как 50 нМ d5PAO и 50 нМ f3PAO значительно

снижали накопление триглицеридов, вызванное обработкой 0,5 мМ олеиновой кислотой (Фиг. 48В).

Клетки HepG2 инкубировали в течение 24 ч с добавлением 0,5 мМ олеиновой кислоты и затем обрабатывали PAO, d5PAO или f3PAO в разных концентрациях в течение 24 ч в соответствии с экспериментальным распределением по группам. (А) Обрабатывали окрашиванием красителем масляный красный О и фотографировали для анализа, масштабная линейка: 50 мкМ; (В) триглицериды детектировали и анализировали методом однофакторного ANOVA, * $p < 0,03$, ** $p < 0,01$, по сравнению с группой, обработанной 0,5 мМ олеиновой кислотой (Фиг. 48).

В этом эксперименте выявлено, что PAO, d5PAO и f3PAO могут предупреждать накопление липидных капель и триглицеридов, вызванное олеиновой кислотой, в гепатоцитах, причем превентивный эффект был значительным, когда концентрация d5PAO и f3PAO составляла 50 нМ, тем самым облегчая повреждение гепатоцитов.

Пример 21. Исследование воздействия PAO и F3PAO на артериальный стеноз

1. Экспериментальные методы

1.1 Проплиферация и миграция васкулярных гладкомышечных клеток крыс (A7R5), индуцированная Ang2 *in vitro*:

Модель пролиферации и миграции гладкомышечных клеток грудной аорты крыс (A7R5) была создана с использованием ангиотензина 2 (1 мкг/мл, Ang2) и разделена на (1) контрольную группу; (2) модельную группу; и (3) группу, обработанную лекарственным средством (в низкой, средней и высокой концентрации). Клетки расщепляли трипсином и высевали в планшеты, и когда плотность клеток достигала 70%, клетки подвергали голоданию, используя среду без сыворотки, в течение 24 часов, затем добавляли Ang2 для моделирования и осуществляли интервенцию PAO и F3PAO в разных последовательных концентрациях в течение 12-24 часов и затем исследовали общую жизнеспособность клеток анализом ССК8. Изменения индекса пролиферации гладкомышечных клеток (PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток)) и индекса миграции (MMP9 (матриксная металлопротеиназа 9), коллаген-1) отслеживали по результатам количественной ПЦР, вестерн-блоттинга и клеточной иммунофлуоресценции.

1.2 Определение жизнеспособности клеток анализом ССК8:

Клетки A7R5 равномерно высевали при плотности 5×10^3 в 96-луночные планшеты (Corning), и после полного прикрепления клеток к стенкам и слияния до 70%-80% клетки подвергали голоданию, используя среду DMEM без сыворотки, в течение 24 часов, затем инкубировали с 1 мкг/мл Ang2 в течение примерно 48 часов, чтобы индуцировать пролиферацию клеток, после чего в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента ССК8

(Beuyotime) и 90 мкл среды DMEM. После инкубирования каждой лунки при 37°C в течение 2 часов оценивали пролиферацию клеток и жизнеспособность клеток путем определения значения поглощения (OD) при длине волны 450 нм с использованием микропланшет-ридера. Для каждой группы было отведено по пять повторных лунок.

1.3 Определение экспрессии PCNA и MMP9 гена методом флуоресцентной количественной ПЦР:

Общую РНК экстрагировали с использованием набора для экстракции РНК (B0004DP, Suzhou EZBioscience Co., Ltd.), и концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометром (Thermo Fisher). кДНК была получена в результате реакции обратной транскрипции 1000 нг общей РНК с использованием набора обратной транскрипции (Shanghai Yi Sheng). кДНК использовали для амплификации генов PCNA и MMP9 методом флуоресцентной количественной ПЦР с использованием набора SYBR Green (Shanghai Yi Sheng), и ген GAPDH использовали в качестве внутреннего стандарта. Последовательности кДНК вышеуказанных генов были загружены с веб-сайта NCBI, и праймеры для ПЦР были синтезированы компанией Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd. Последовательности праймеров были следующие:

PCNA: прямой TGGACTTAGACGTTGAGCAACTTGG, обратный GCACAGGAGATCACCACAGCATC;

MMP9: GATCCCCAGAGCGTACTCG, GTTGTGGAAACTCACACGCC;

Col 1A: прямой TAAGGGTCCCCAATGGTGAGA, обратный GGGTCCCTCGACTCCTACAT;

GAPDH: прямой CCAGGCGCCCAATACC, обратный CCACATCGCTCAGACACCAT.

1.4 Определение экспрессии белков PCNA, MMP9 и Col 1A методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга) клеточных экстрактов:

Среду аспирировали, и чашки Петри промывали 2 раза PBS. В зависимости от общего количества культивируемых клеток добавляли соответствующее количество буфера для лизиса RIPA, содержащего ингибитор протеазы (Beuyotime), и клетки подвергали лизису на льду в течение 30 минут, на протяжении которых клетки несколько раз перемешивали на вортексе и встряхивали, чтобы обеспечить достаточный лизис белков. Затем лизат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C, и надосадочная жидкость представляла собой полученный общий клеточный белок. Белок количественно определяли с использованием набора BCA (Beuyotime). 30 мкг белка подвергали электрофорезу путем нанесения геля из набора для приготовления геля SDSPAGE (Epizyme). В качестве первичных антител использовали антитела Col 1A (Abcam), PCNA (Abcam) и MMP9 (Abcam); в качестве вторичного антитела использовали

антитело, меченное HRP (Beuyotime), и в качестве внутреннего стандарта использовали GAPDH. Полосы анализировали по шкале серых оттенков с использованием программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0.

1.5 Тест на способность клеток A7R5 мигрировать (скретч-анализ):

Клетки A7R5 инокулировали в 6-луночные планшеты вдоль нарисованных параллельных линий. Когда плотность клеток составляла примерно 80%, клетки подвергали голоданию (культивировали в среде без сыворотки) в течение 24 ч. После этого по ранее нарисованным параллельным линиям кончиком стерилизованной пипетки объемом 200 мкл делали царапины. Клетки трижды промывали раствором PBS, слущенные клетки аспирировали и отбрасывали, после чего клетки подвергали Ang2-моделированию и фармакологической интервенции, используя по три повторных лунки для каждой группы соответственно. Миграцию клеток в процарапанную зону наблюдали под инвертированным микроскопом через 0 ч и 48 ч соответственно. Ширину царапины и площадь царапины после миграции в каждом поле зрения микроскопа анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ, и скорость миграции вычисляли в виде процента площади царапины после миграции от исходной площади царапины.

1.6. Статистическая обработка:

Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения SPSS22.0. Информацию об измерениях выражали в виде $x \pm s$, и для сравнения между двумя группами использовался критерий Стьюдента независимой выборки; более 3 групп статистически анализировали с использованием метода однофакторного ANOVA, между группами анализировали с использованием критерия Бонферрони, и счетную информацию выражали в виде показателя (%), и для сравнения между группами использовали критерий χ^2 . $p < 0,05$ считали статистическим различием. # указано сравнение с контролем, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$. * указано сравнение с моделью, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

2. Результаты

2.1 F3PAO ингибирует Ang2-стимулированный рост васкулярных гладкомышечных клеток (анализ ССК8)

Результаты показали (Фиг. 49), что при введении 1 мкг/мл Ang2 пролиферационная способность васкулярных гладкомышечных клеток значительно повышалась по сравнению с контрольной группой, с $92\% \pm 0,9\%$ в контрольной группе до примерно $150\% \pm 3,5\%$ в модельной группе (### $p < 0,0001$), что указывает на то, что интервенция Ang2 стимулирует пролиферацию и миграцию васкулярных гладкомышечных клеток. Добавление F3PAO в разных концентрациях в условиях интервенции Ang2,

соответственно, выявило, что пролиферационная и миграционная способность васкулярных гладкомышечных клеток снижается, и при достижении концентрации F3PAO 50 нМ имеет место статистическое различие по сравнению с модельной группой (50 нМ, ** $p < 0,001$, >100 нМ, *** $p < 0,0001$). С другой стороны, F3PAO в концентрации ниже 50 нМ существенно не изменяет ингибирование жизнеспособности клеток. Эксперименты показали, что F3PAO может эффективно ингибировать рост Ang2-стимулированных васкулярных гладкомышечных клеток. $n=3$, обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA с критерием Стьюдента между группами, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM.

2.2 F3PAO ингибирует Ang2-индуцированную экспрессию PCNA, MMP9 гена в клетках A7R5 (количественная ПЦР, кПЦР)

PCNA, MMP9 является типичным белком-маркером пролиферации и миграции. кПЦР выявила, что экспрессия гена MMP9 значительно увеличилась после интервенции Ang2 (со 100% до 173% \pm 10,2%, $P < 0,0001$), при этом F3PAO (50, 100 нМ) мог ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который является дозозависимым ингибирующим эффектом: чем выше концентрация F3PAO, тем значительней ингибирующий эффект. Экспрессия MMP9 составила 93% \pm 7,6%, $P < 0,05$; и 80% \pm 6,1%, $P < 0,001$ соответственно. (Фиг. 50А).

Экспрессия PCNA также значительно увеличилась после интервенции Ang2 (со 100% до 156% \pm 8,2%), при этом F3PAO (50, 100 нМ) мог ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который является дозозависимым ингибирующим эффектом: чем выше концентрация F3PAO, тем значительней ингибиторный эффект (экспрессия PCNA составляла 115% \pm 4,7%, $P < 0,0001$ и 91% \pm 10,7%, $P < 0,0001$, соответственно) (Фиг. 50В). $n=3$, обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA с критерием Стьюдента между группами, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM.

2.3 F3PAO ингибирует Ang2-индуцированную экспрессию белков PCNA и MMP9 в клетках A7R5 (WB)

Экспрессия белка PCNA значительно увеличилась после интервенции Ang2 (со 100% до 161% \pm 10,2%, $P < 0,0001$), при этом F3PAO (50, 100 нМ) мог ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект, который является дозозависимым ингибирующим эффектом: чем выше концентрация F3PAO, тем значительнее ингибирующий эффект (экспрессия PCNA составляла 118% \pm 3,0%, $P < 0,05$; и 89% \pm 8,3%, $P < 0,001$, соответственно) (Фиг. 51А, С).

Экспрессия белка MMP9 значительно увеличилась после интервенции Ang2 (со 100% до 245% \pm 15,2%, $P < 0,0001$), при этом F3PAO (50, 100 нМ) мог ингибировать этот

усиливающий экспрессию эффект, который является дозозависимым ингибирующим эффектом: чем выше концентрация F3PAO, тем значительнее ингибирующий эффект. (экспрессия MMP9 составляла $174\% \pm 14,4\%$, $P < 0,05$ и $158\% \pm 15,3\%$, $P < 0,05$ соответственно) (Фиг. 51Б, С). $n=3$, обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA с критерием Стьюдента между группами, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM.

2.4 PAO/F3PAO/GSK-A1 ингибируют индуцированную Ang2-стимуляцией клеточную экспрессию белка коллагена-1 (WB)

На Фиг. 52А результаты WB показывают, что Ang2 значительно увеличивает экспрессию белка коллагена-1 в васкулярных гладкомышечных клетках (со 100% до $220\% \pm 22,4\%$, $P < 0,001$), а PAO/F3PAO (50 нМ) может ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект. Экспрессия коллагена-1 составляла $136\% \pm 8,7\%$, $P < 0,05$ и $104\% \pm 5,8\%$, $P < 0,001$ соответственно. На Фиг. 52В результаты WB показывают, что Ang2 значительно увеличивает экспрессию белка коллагена-1 в васкулярных гладкомышечных клетках (со 100% до $223\% \pm 15,0\%$, $P < 0,001$), а GSK-A1 (25 нМ, 50 нМ) может ингибировать этот усиливающий экспрессию эффект. Экспрессия коллагена-1 составила $160\% \pm 9,0\%$, $P < 0,05$ и $120\% \pm 7,2\%$, $P < 0,001$ соответственно. $n=3$, обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA с критерием Стьюдента между группами, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). Учитывая, что GAK-A1 является ингибитором PI4KIII α , результаты WB свидетельствуют о том, что PI4KIII α , вероятно, связан с отложением коллагена в васкулярных гладкомышечных клетках или сосудистым склерозом, позволяя полагать, что ингибирование PI4KIII α может снижать склероз сосудов.

2.5 F3PAO ингибирует Ang2-индуцированное усиление миграции васкулярных гладкомышечных клеток (скретч-анализ)

Скретч-анализ показал, что миграционная способность клеток значительно увеличилась после интервенции Ang2 со 100% в контрольной группе до $184\% \pm 7,4\%$ ($P < 0,0001$), при этом F3PAO (50 нМ и 100 нМ) может эффективно ингибировать рост миграционной способности ($155\% \pm 6,4\%$, $P < 0,05$ и $147\% \pm 4,1\%$, $P < 0,0001$) (Фиг. 53). $n=3$, между группами использовали анализ по критерию Стьюдента, и данные выражали в виде среднего значения \pm SEM. (% миграции = (начальная площадь царапины - площадь царапины через 24 ч)/начальная площадь царапины \times 100%).

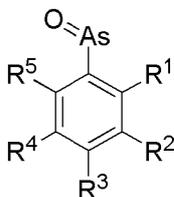
Приведенные выше результаты показали, что F3PAO может ингибировать Ang2-индуцированную пролиферацию и миграцию васкулярных гладкомышечных клеток, культивированных *in vitro*. Также было обнаружено, что PAO/F3PAO/GSK-A1 могут

ингибировать индуцированное Ang2-стимуляцией увеличение экспрессии коллагена в васкулярных гладкомышечных клетках на уровне белков, и эти результаты свидетельствуют о том, что F3PAO может оказывать ингибирующее воздействие на стеноз сосудистой сети после повреждения эндотелия, вызванного различными причинами. PAO/F3PAO/GSK-A1 могут ингибировать коллаген на гладкой мускулатуре сосудов и, следовательно, может быть новым лекарственным средством для ингибирования гипертензии, а также позднего склероза сосудов после PCI (чрескожное коронарное вмешательство).

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что хотя конкретные воплощения настоящего изобретения описаны в данном документе в целях иллюстрации, различные их модификации могут быть сделаны, не отступая от замысла и объема настоящего изобретения. Таким образом, конкретные воплощения и примеры настоящего изобретения не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Настоящее изобретение ограничено только прилагаемой формулой изобретения. Вся литература, процитированная в настоящем документе, включена в него во всей ее полноте посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль,

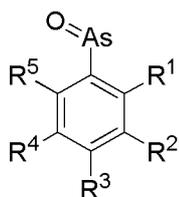


Формула (I)

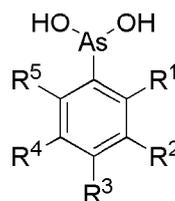
где R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 независимо выбраны из водорода, дейтерия, фтора, хлора, брома, йода, метила, амина, нитро, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, монофторметила, дифторметила или трифторметила, и по меньшей мере один из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляет собой галоген или дейтерий.

2. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 независимо выбраны из водорода или дейтерия или галогена, и по меньшей мере один из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляет собой галоген, по меньшей мере два из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляют собой галоген, предпочтительно по меньшей мере два, три, четыре или пять из R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 представляют собой фтор.

3. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение формулы (I) возможно образует соединение формулы (I') при растворении в растворителе, в частности в водном растворителе, где R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 имеют такое же значение, как описано в предыдущих пунктах.

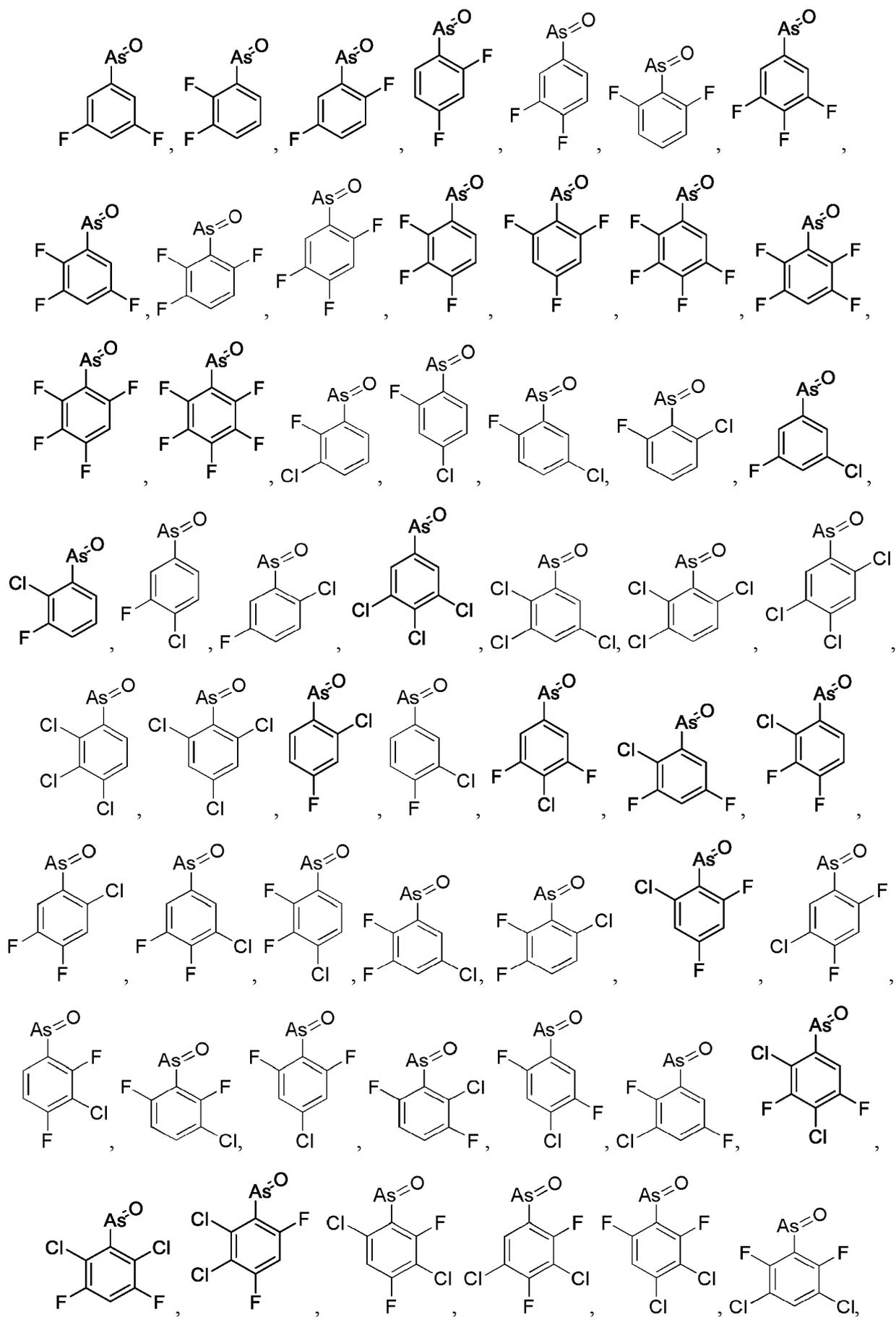


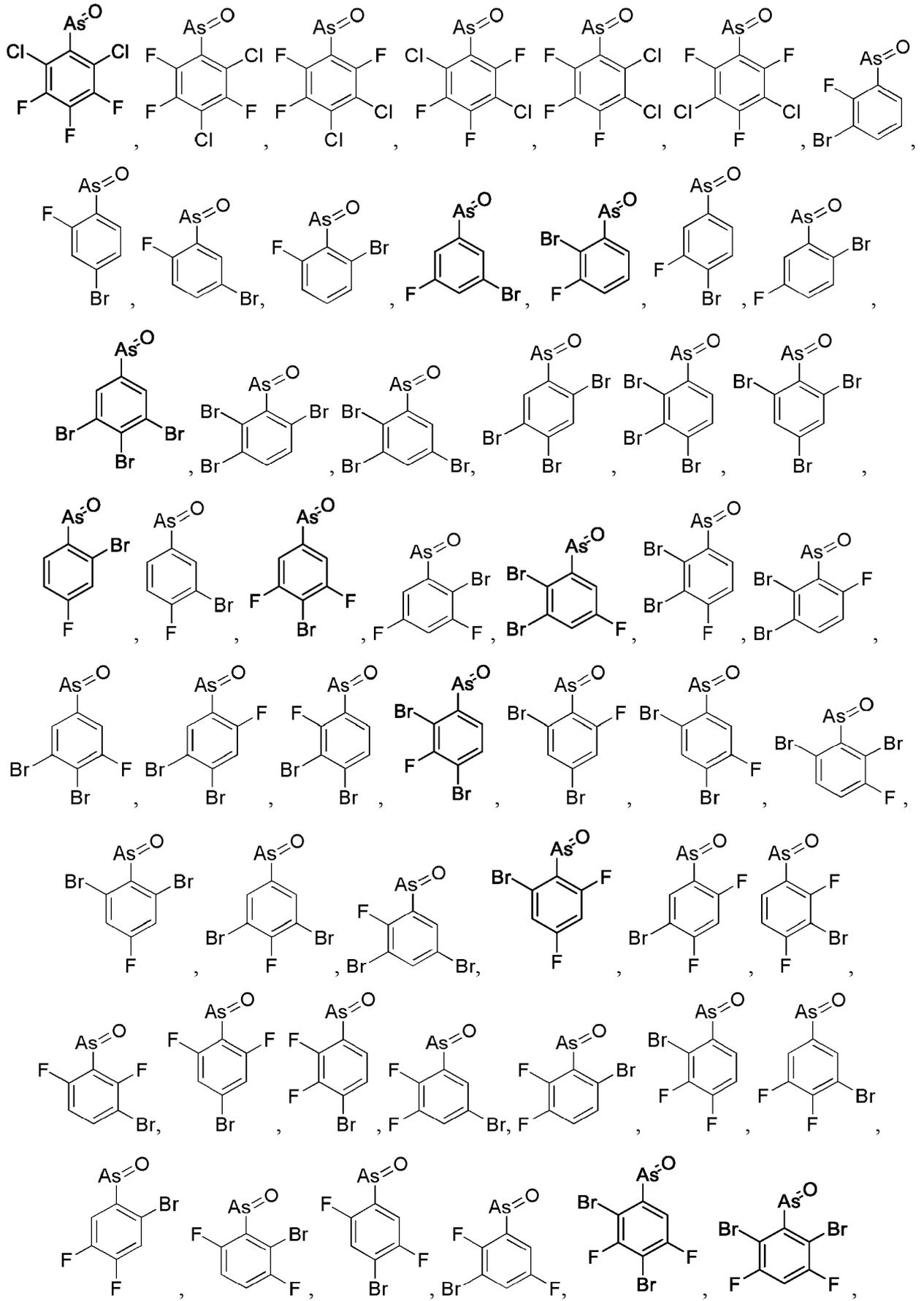
Формула (I)

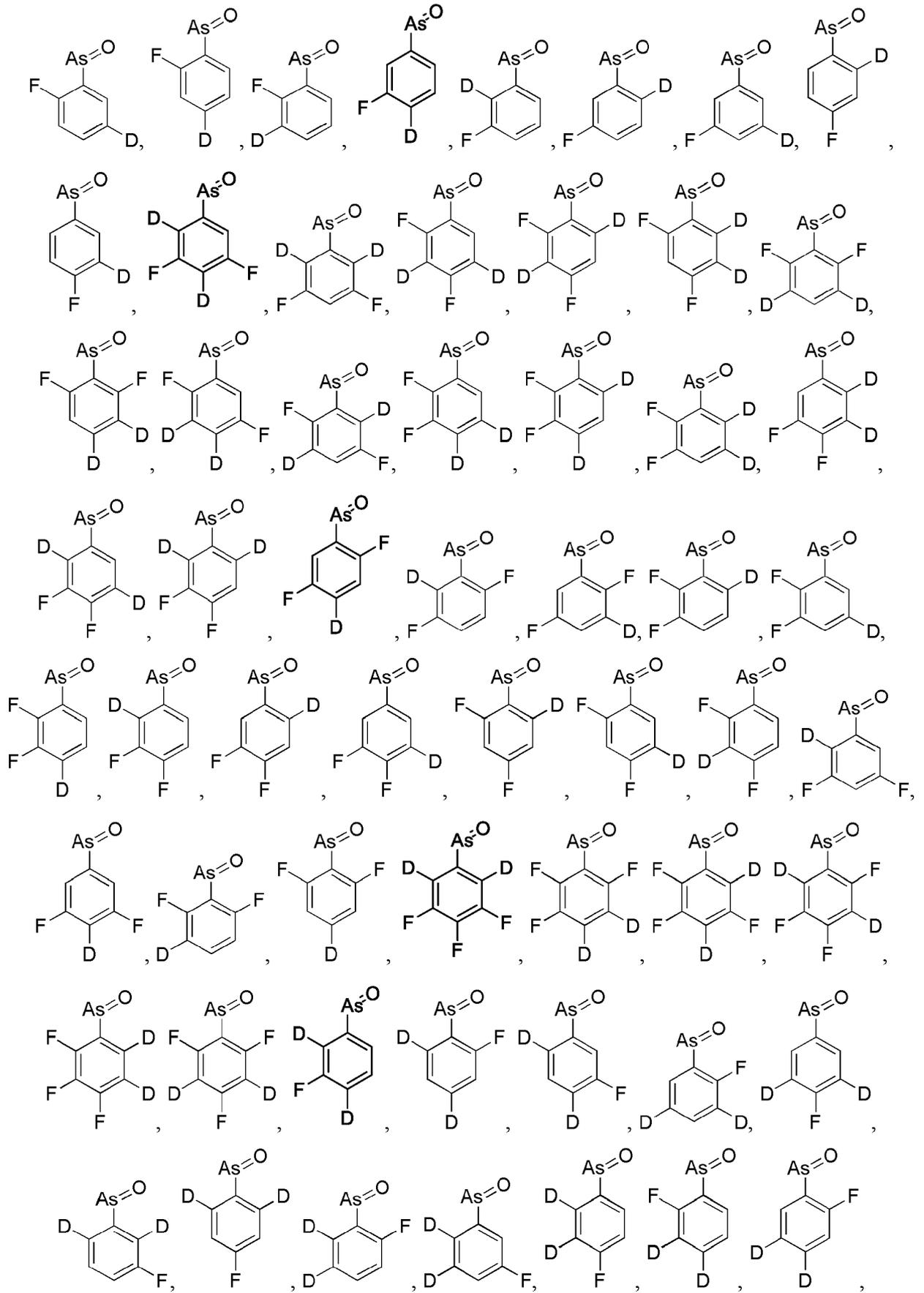


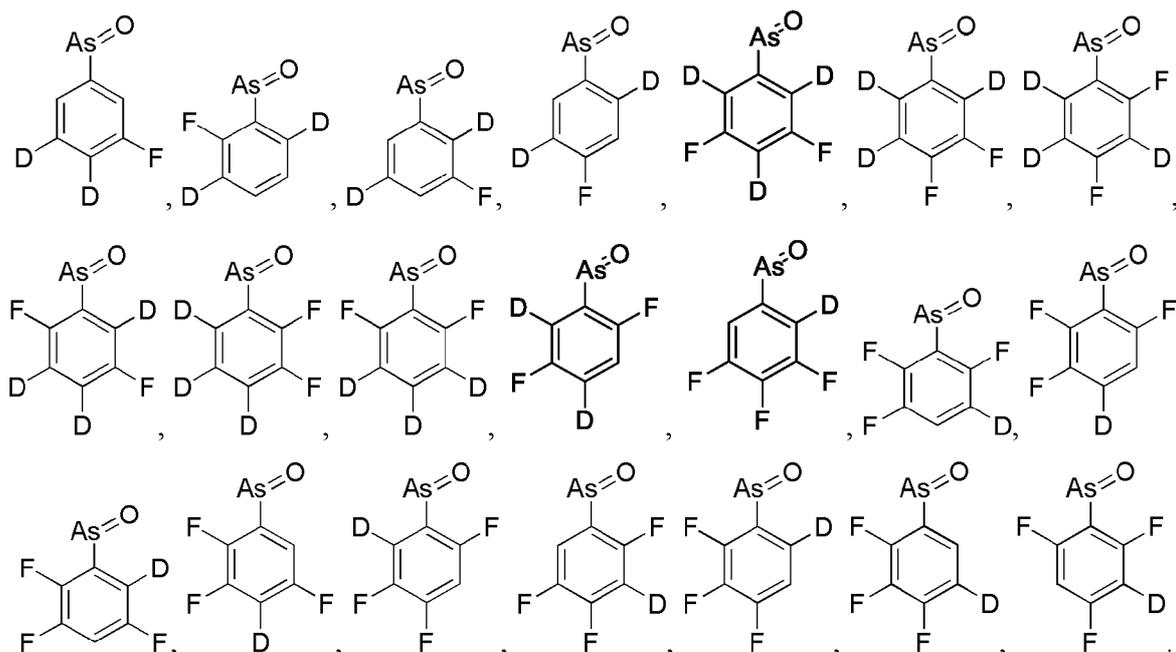
Формула (I')

4. Соединение по п. 2 или п. 3 или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:









5. Применение соединения по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания или патологической реакции у субъекта.

6. Применение по п. 5, где заболевание выбрано из по меньшей мере одного из опухоли, злокачественного заболевания, такого как злокачественная опухоль или злокачественное заболевание, вызванное химиотерапевтическим лекарственным средством для лечения опухоли, болезни Альцгеймера, заболевания, связанного с неправильной внутриклеточной укладкой белка, лизосомной болезни накопления, воспалительной реакции, фиброза тканей или органов, вирусных заболеваний, невроза, микробной инфекции, такой как инфицирование лекарственно-устойчивыми микроорганизмами, повреждения клеточной ткани в результате воздействия радиации, атеросклероза, диабета и астмы.

7. Применение по п. 5, где субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком.

8. Применение по п. 6, где опухоль выбрана из лимфомы (например, острой не-В- или не-Т-клеточной лимфомы), рака шейки матки, рака эндометрия, рака печени, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого или мелкоклеточного рака легкого), колоректального рака, рака желудка, рака кожи (например, меланомы), рака кости, остеосаркомы, миеломы, рака крови (например, острого или хронического лейкоза), рака яичника, опухоли предстательной железы, опухоли головного мозга (например,

церебральной астроцитомы), нейробластомы, рака щитовидной железы, злокачественной эмбриональной рабдомиосаркомы.

9. Применение по п. 6, где заболевание, связанное с неправильной внутриклеточной укладкой белка, представляет собой болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию, миозит с тельцами-включениями, лобно-височную деменцию, болезнь Гентингтона, полиглутаминовую болезнь, боковой амиотрофический склероз или прионную болезнь.

10. Применение по п. 6, где лизосомная болезнь накопления представляет собой нарушение метаболизма сфинголипидов, такое как болезнь Гоше, болезнь Ниманна типа С, мукополисахаридоз, болезнь накопления гликогена, болезнь накопления гликопротеинов, болезнь накопления липидов, дефекты посттрансляционной модификации, расстройство делеции внутреннего мембранного белка, нейрональный восковидный плазменный липофусциноз или нарушение функции органелл, связанное с лизосомами.

11. Применение по п. 6, где воспалительная реакция представляет собой повышение уровня воспалительных факторов, таких как TNF α (фактор некроза опухоли альфа) или IL-6 (интерлейкин-6) в локальной ткани или в крови по всему организму.

12. Применение по п. 6, где фиброз ткани или органа выбран из фиброза сердца, фиброза почки, фиброза легкого, фиброза печени, фиброза в ходе заживления ран, или рестеноза из-за образования рубцов, или фиброза после установки артериального стента.

13. Применение по п. 6, где вирус включает в себя коронавирус и вирус, не являющийся коронавирусом, предпочтительно коронавирус выбран из вируса инфекционного бронхита курицы, вируса эпидемической диареи свиней, вируса инфекционного гастроэнтерита свиней, вируса гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней, δ -коронавируса свиней, респираторного коронавируса собак, вируса мышинового гепатита, коронавируса кошек, коронавируса человека, вируса папилломы человека, вируса тяжелого острого респираторного синдрома, вируса ближневосточного респираторного синдрома или нового коронавируса; вирус, не являющийся коронавирусом, выбран из вируса гепатита С или ВИЧ (вирус иммунодефицита человека).

14. Применение по п. 6, где невроз выбран из неврастении, тревоги, депрессии или мании.

15. Применение по п. 6, где микробная инфекция выбрана из бактериальной или грибковой инфекции, предпочтительно лекарственно-устойчивой бактериальной инфекции или лекарственно-устойчивой грибковой инфекции; более предпочтительно, где микроорганизм выбран из *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Serratia marcescens, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium tetani*, *Propionibacterium acnes*, *Cryptococcus neoformans*, *Helicobacter pylori*, *Bacterioides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Trichomonas vaginalis*, и по меньшей мере одного из их лекарственно-устойчивых организмов; или, предпочтительно, микробная инфекция выбрана из микроорганизма, инфицирующего поверхность тела или участок слизистой оболочки, такой как участок угревой раны, прыща, раны, ожога или ошпаривания.

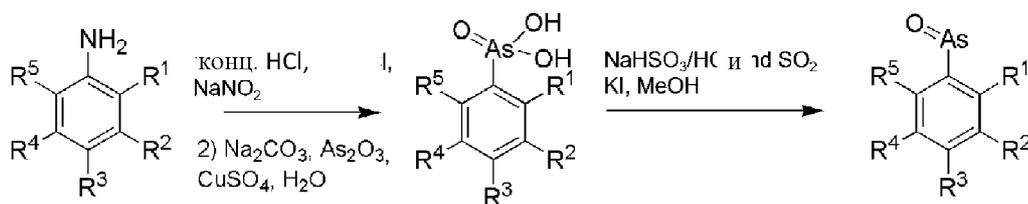
16. Применение по любому из пп. 6-15, дополнительно включающее введение второго реагента нуждающемуся в этом субъекту.

17. Применение по п. 16, где соединение по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемую соль вводят до, после или одновременно со вторым реагентом.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, дополнительно содержащая второй агент, такой как лекарственное средство для лечения опухолей, где лекарственное средство для лечения опухолей предпочтительно представляет собой противоопухолевое средство, препятствующее митозу, такое как паклитаксел или альбумин-паклитаксел, лекарственное средство, непосредственно влияющее на структуру и функцию ДНК, такое как карбоплатин или цисплатин, или ингибитор KRAS (вирус крысиной саркомы Кирстена).

20. Способ получения соединения по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемой соли, включающий следующие стадии:



1) добавление концентрированной соляной кислоты и водного нитрита натрия в водный раствор анилина, имеющего структуру формулы (I), или его соли при 0°C-10°C и поддержание температуры ниже 5°C;

2) нагревание водного раствора карбоната натрия, триоксида мышьяка, сульфата меди до 90-100°C и затем охлаждение этого водного раствора, добавление раствора, приготовленного на стадии 1, в этот водный раствор, перемешивание, фильтрование и добавление кислоты в фильтрат для корректировки pH, и выделение выпавшего в осадок твердого вещества;

3) перемешивание вышеуказанного выпавшего в осадок твердого вещества, йодида калия, бисульфита натрия или соляной кислоты и диоксида серы в метаноле до завершения реакции и последующая обработка с получением указанного соединения.

21. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения фиброза миокарда.

22. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения повреждения клеток и тканей, вызванного воздействием радиации, у пациента с опухолью.

23. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора оксида фениларсина и его производного в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения атеросклероза или заболевания, вызванного атеросклерозом, где заболеванием, вызванным атеросклерозом, предпочтительно является ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда или церебральный инфаркт.

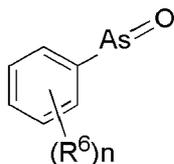
24. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения диабета у пациента с опухолью.

25. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения микробной инфекции, где микробная инфекция выбрана из бактериальной или грибковой инфекции, предпочтительно лекарственно-устойчивой бактериальной инфекции или лекарственно-устойчивой грибковой инфекции; более предпочтительно, где микроорганизм выбран из *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium tetani*, *Propionibacterium acnes*, *Cryptococcus neoformans*, *Helicobacter pylori*, *Bacterioides fragilis*, *Clostridium difficile*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Trichomonas vaginalis*, и по меньшей мере одного из их лекарственно-устойчивых организмов; или, предпочтительно, микробная инфекция выбрана из микроорганизма, инфицирующего поверхность тела или участок слизистой оболочки, например участок угревой раны, прыща, раны, ожога или ошпаривания.

26. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения астмы.

27. Применение Р14КШ α -специфического ингибитора в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения неалкогольного стеатогепатита.

28. Применение по любому из пп. 21-27, где оксид фениларсина и его производное представляют собой антитело, низкомолекулярное соединение, молекулу РНК-интерференции или антисмысловую нуклеиновую кислоту; предпочтительно, антитело представляет собой моноклональное или поликлональное антитело, более предпочтительно антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело; предпочтительно, молекула РНК-интерференции представляет собой короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК) или микроРНК (миРНК), предпочтительно молекула РНК-интерференции имеет длину 18-100 оснований и/или молекула РНК-интерференции модифицирована для повышения ее стабильности; предпочтительно, низкомолекулярное соединение представляет собой оксид фениларсина или его производное, G1 и его аналог, A1 и его аналог (J Med Chem 2014 Vol. 57 Issue 5 Pages 2091-106 и J Biol Chem 2014 Vol. 289 Issue 9 Pages 6120-32), или симепивир и его аналог (Int J Radiation Oncol Biol Phys, Vol. 96, No. 4, pp. 867e876, 2016), TG-1478 (Tyrphostin AG-1478, NSC-693255), более предпочтительно оксид фениларсина и его производное имеют структуру формулы (II), или их фармацевтически приемлемую соль:



Формула (II)

где каждый R^6 независимо выбран из (а) водорода, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксила, amino, карбамоила, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C2-6-алкинила, C2-6-алкенила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, C1-6-алкилен-NH₂, C1-6-алкилен-NH-C(O)H, -As(O), -N=NH, N-(C1-6-алкил)амино, N,N-(C1-6-алкил)₂амино, -NH-C(O)H, -NH-S(O)₂H, -C(O)OH, -OC(O)H, -SH, -S(O)₂H, -S(O)₂-NH₂ или гетероциклила, который возможно замещен R^7 или R^8 , где R^7 и R^8 , каждый независимо, выбраны из amino, C1-6-алкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, N-(C1-6-алкил)амино, N-(6-12-членный-арил)амино, N,N-(C1-6-алкил)₂амино, C3-6-циклоалкила, 6-12-членного арила или 3-12-членного гетероциклила, который возможно замещен одним или более чем одним галогеном, нитро, циано, гидроксилом, amino, карбамоилом, -NH-C(O)- R^{10} , -C(O)OR⁹, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилем, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или $Vn-O-$, и R^9 представляет собой C1-6-алкил, который возможно замещен одним или более чем одним

галогеном, нитро, циано, гидроксилом, амина, карбамоилом, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилом, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или Vn-O-, и R¹⁰ выбран из H, C1-6-алкила, C2-6-алкинила, C2-6-алкенила, C1-6-алкоксила или C1-6-галогеналкила, и/или

(b) R⁶ на двух соседних атомах углерода образует 5-12-членный циклоалкил, арил или гетероциклил, который возможно замещен одним или более чем одним галогеном, нитро, циано, гидроксилом, амина, карбамоилом, 6-12-членным арилом, C1-6-алкилом, C2-6-алкинилом, C2-6-алкенилом, C1-6-алкоксилом, C1-6-галогеналкилом, 3-6-членным гетероциклилом, C3-6-циклоалкилом или Vn-O-,

где n представляет собой целое число от 0 до 5.

29. Применение по п. 28, где n представляет собой целое число от 0 до 2, каждый R⁶ независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксидла, амина, карбамоила, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, -As(O), N-(C1-6-алкил)амино, N,N-(C1-6-алкил)₂амино, -NH-C(O)H или -NH-S(O)₂H, который возможно замещен R⁷ или R⁸.

30. Применение по п. 28, где n представляет собой целое число от 0 до 2, каждый R¹ независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, нитро, циано, гидроксидла, амина, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-алкила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, -As(O), -NH-C(O)H или -NH-S(O)₂H, который возможно замещен R⁷ или R⁸.

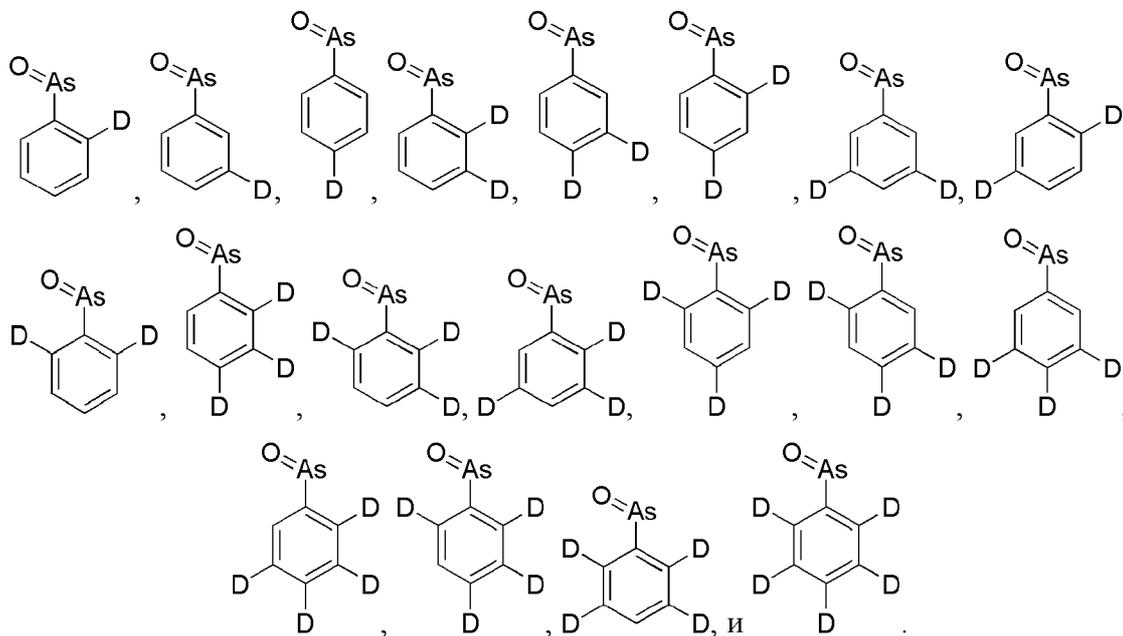
31. Применение по п. 28, где n равно 1 или 2, каждый R⁶ независимо выбран из H, дейтерия, метила, монодейтерометила, дидейтерометила, тридейтерометила, галогена, амина, C1-6-алкилсульфонила, C1-6-циклоалкила, C1-6-алкоксила, C1-6-галогеналкила, -NH-C(O)R⁷ или -NH-S(O)2R⁸, где R⁷ представляет собой C1-6-алкил, который возможно замещен 6-12-членным арилом, R⁸ представляет собой 6-12-членный арил, который возможно замещен одним галогеном, C1-6-алкоксилом или C1-6-галогеналкилом.

32. Применение по п. 31, где R⁶ расположен в *орто*-положении и/или *пара*-положении группы -As(O).

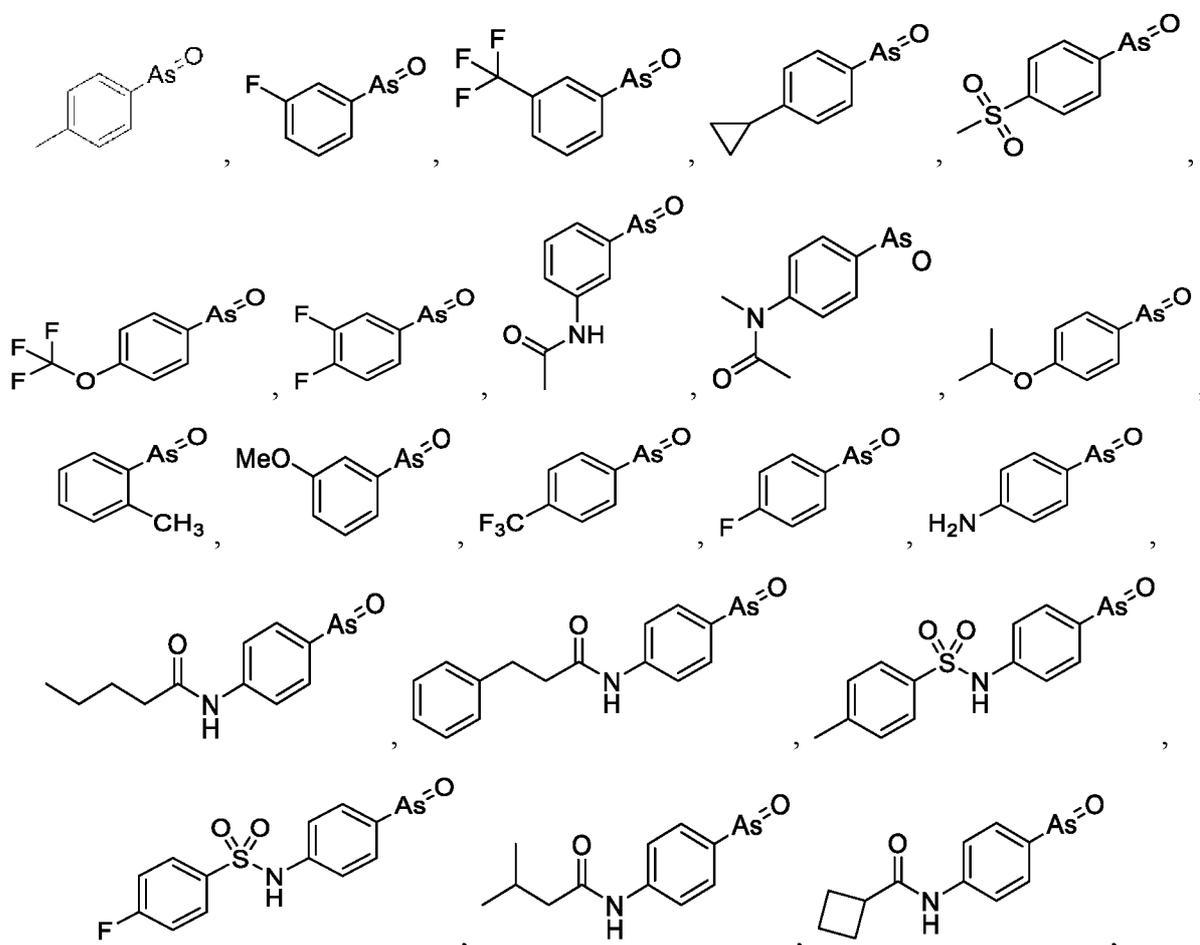
33. Применение по п. 28, где n равно 0.

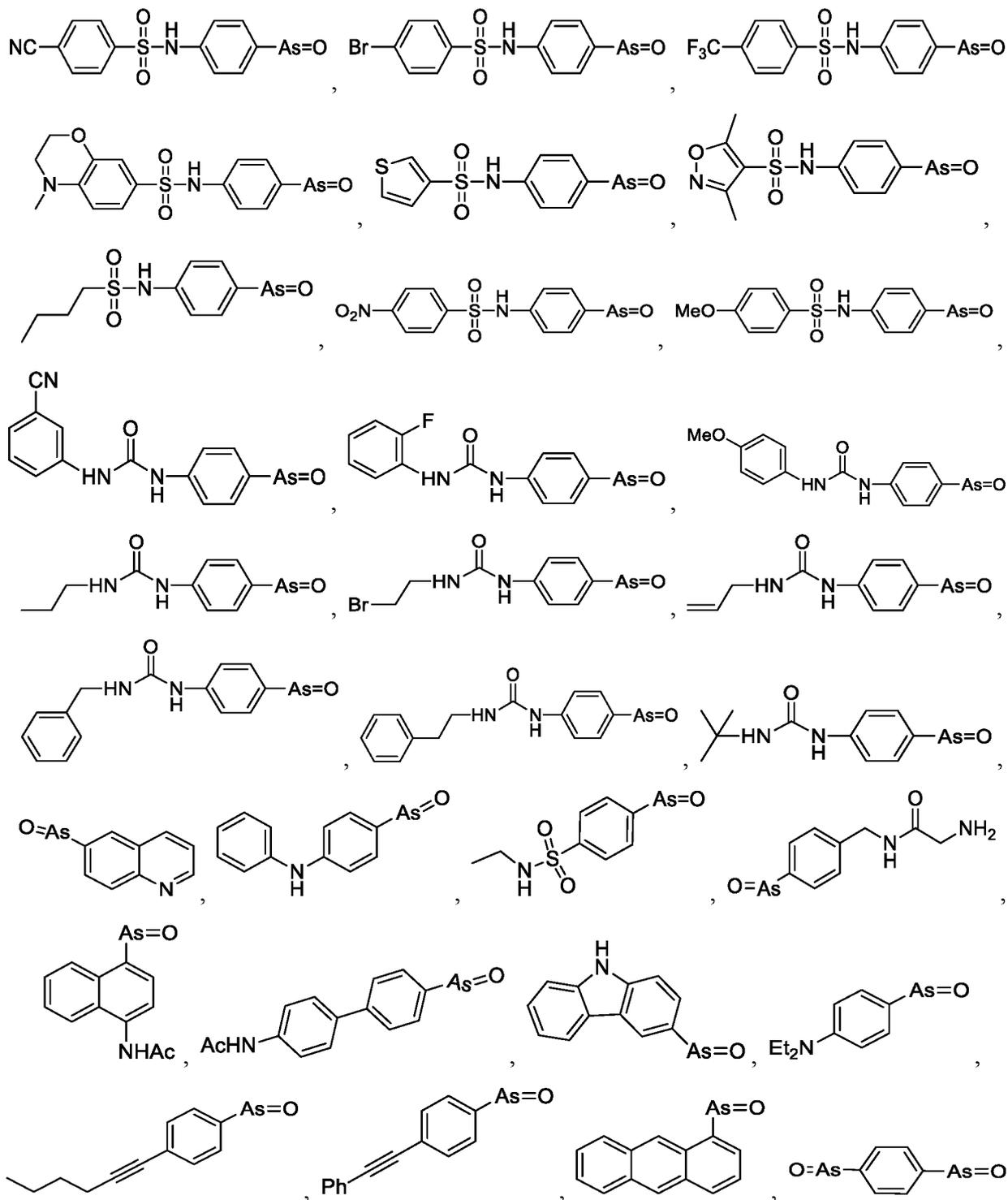
34. Применение по п. 28, где R¹, R², R³, R⁴, R⁵ независимо выбраны из H, дейтерия, галогена, метила, монодейтерометила, дидейтерометила или тридейтерометила, и по меньшей мере один из R¹, R², R³, R⁴, R⁵ представляет собой дейтерий или является дейтерированным; предпочтительно, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ независимо выбраны из H или дейтерия, и по меньшей мере один из R¹, R², R³, R⁴, R⁵ представляет собой дейтерий, по

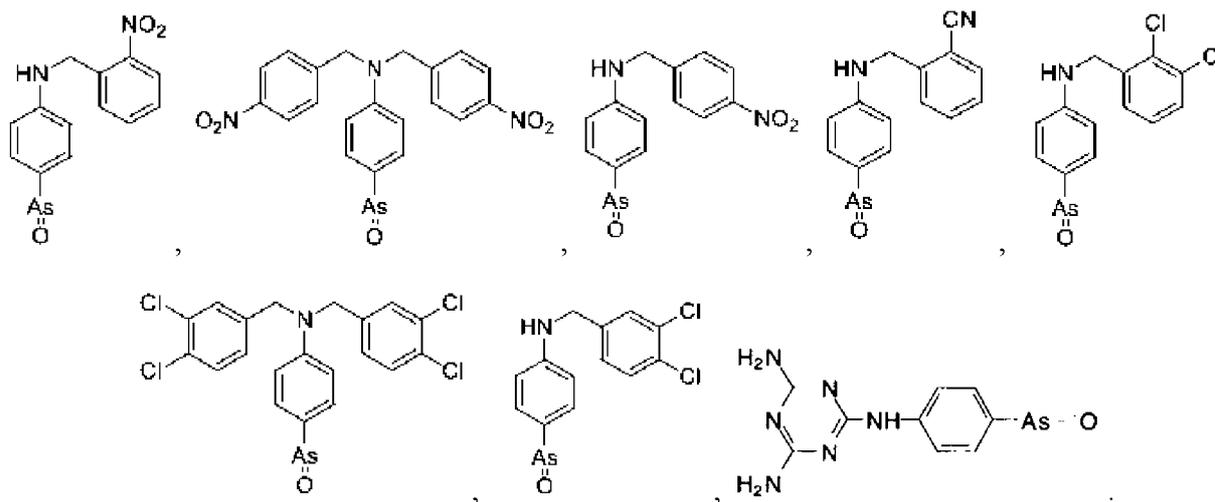
меньшей мере два из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляют собой дейтерий, предпочтительно, по меньшей мере три, четыре или пять из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 представляют собой дейтерий; более предпочтительно, соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:



35. Применение по п. 28, где соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:







36. Применение по любому из пп. 21-27, где субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком.

37. Применение по п. 24, где опухоль выбрана из лимфомы (например, острой не-В- или не-Т-клеточной лимфомы), рака шейки матки, рака эндометрия, рака печени, рака молочной железы (например, трижды негативного рака молочной железы), рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого или мелкоклеточного рака легкого), колоректального рака, рака желудка, рака кожи (например, меланомы), рака кости, остеосаркомы, миеломы, рака крови (например, острого или хронического лейкоза), рака яичника, опухоли предстательной железы, опухоли головного мозга (например, церебральной астроцитомы), нейробластомы, рака щитовидной железы, злокачественной эмбриональной рабдомиосаркомы.

38. Применение по п. 24, дополнительное включающее введение второго реагента нуждающемуся в этом субъекту; предпочтительно, второй реагент представляет собой реагент, используемый для лечения опухоли.

39. Применение по п. 38, где соединение вводят до, после или одновременно со вторым реагентом.

40. Аналитический способ измерения концентрации РАО (оксид фениларсина) или его производного в крови, где производное включает соединение формулы (I) или формулы (II), включающий следующие стадии:

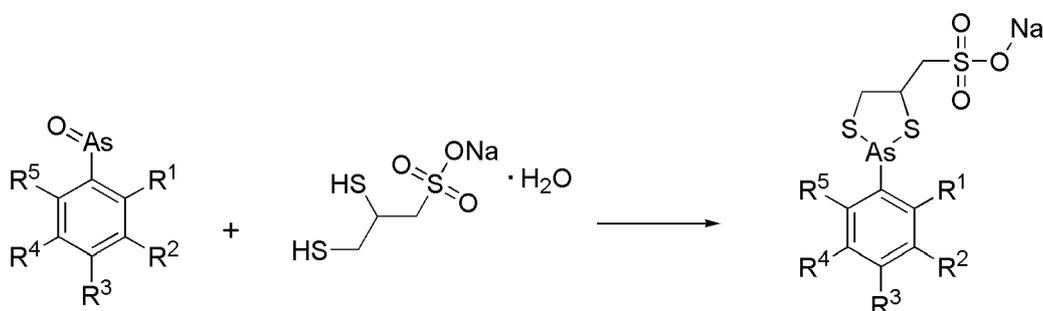
Стадия 1: приготовление трех исходных растворов путем растворения РАО или его производного, контрольного стандарта и 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия соответственно в отдельных контейнерах;

Стадия 2: смешивание крови, содержащей подлежащий тестированию РАО или его производное с исходным раствором 2,3-димеркаптопропансульфоната натрия, доведение

раствора до кислотности и инкубирование при 25-80°C в течение соответствующего периода времени;

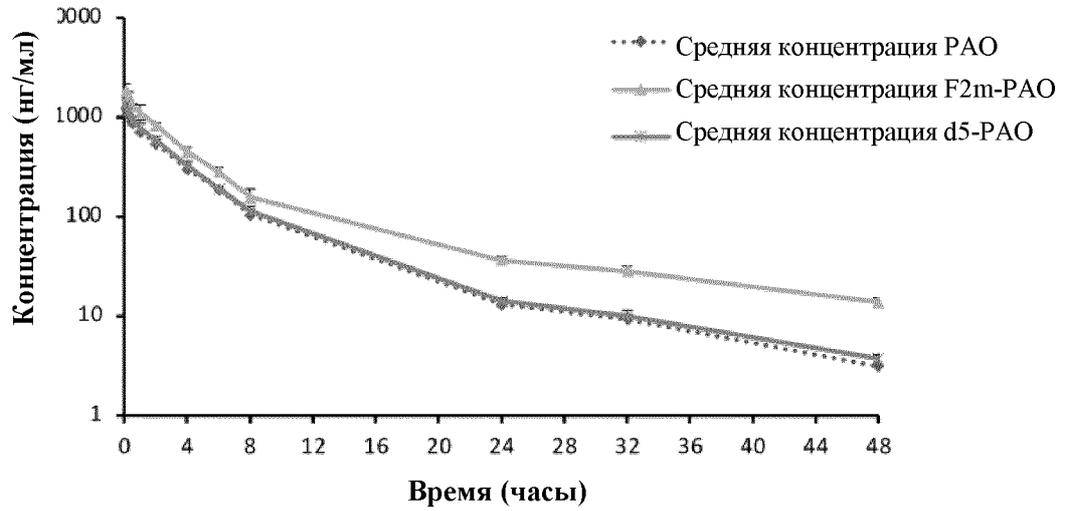
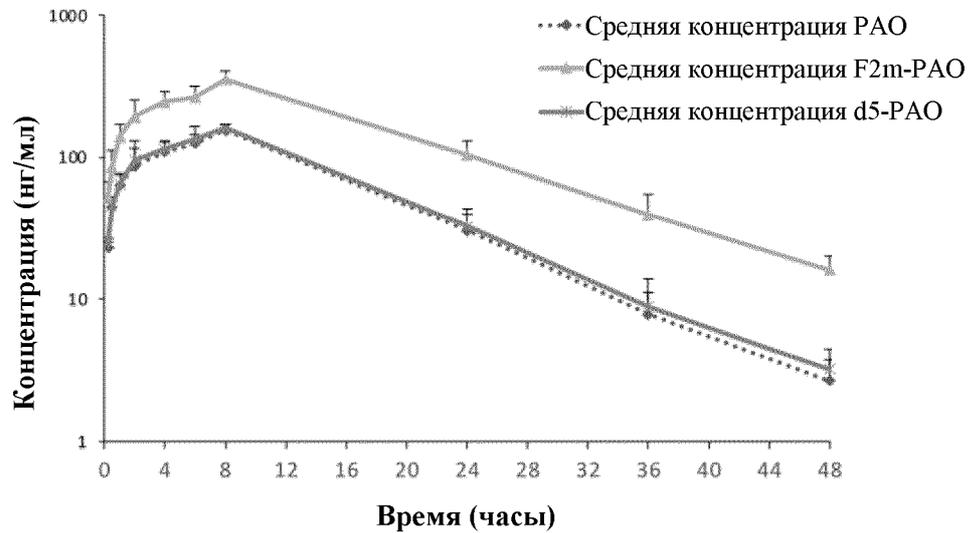
Стадия 3: добавление исходного раствора контрольного стандарта в раствор, полученный на стадии 2, встряхивание в течение определенного периода времени и центрифугирование, и отбор надосадочной жидкости для тестирования продукта дериватизации PAO или его производного.

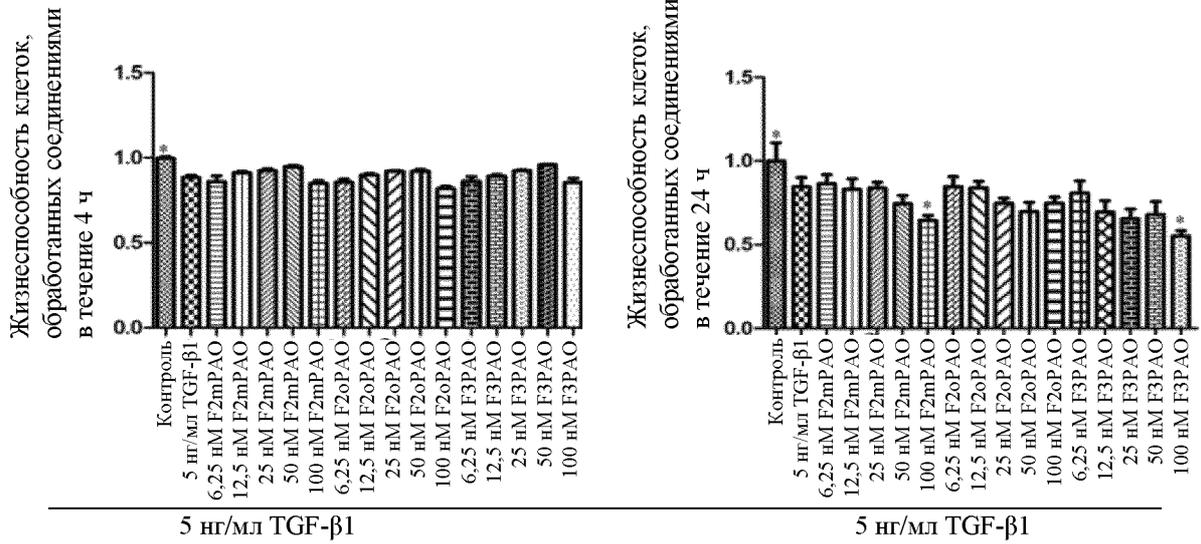
41. Аналитический способ по п. 40, где на стадии 2 время инкубирования составляет 10-80 минут, кислотность представляет собой pH менее 6, раствор доводят до кислотности добавлением соответствующего количества кислоты, такой как муравьиная кислота, гидрофосфат калия, уксусная кислота или соляная кислота, и реакция на стадии 2 следующая:



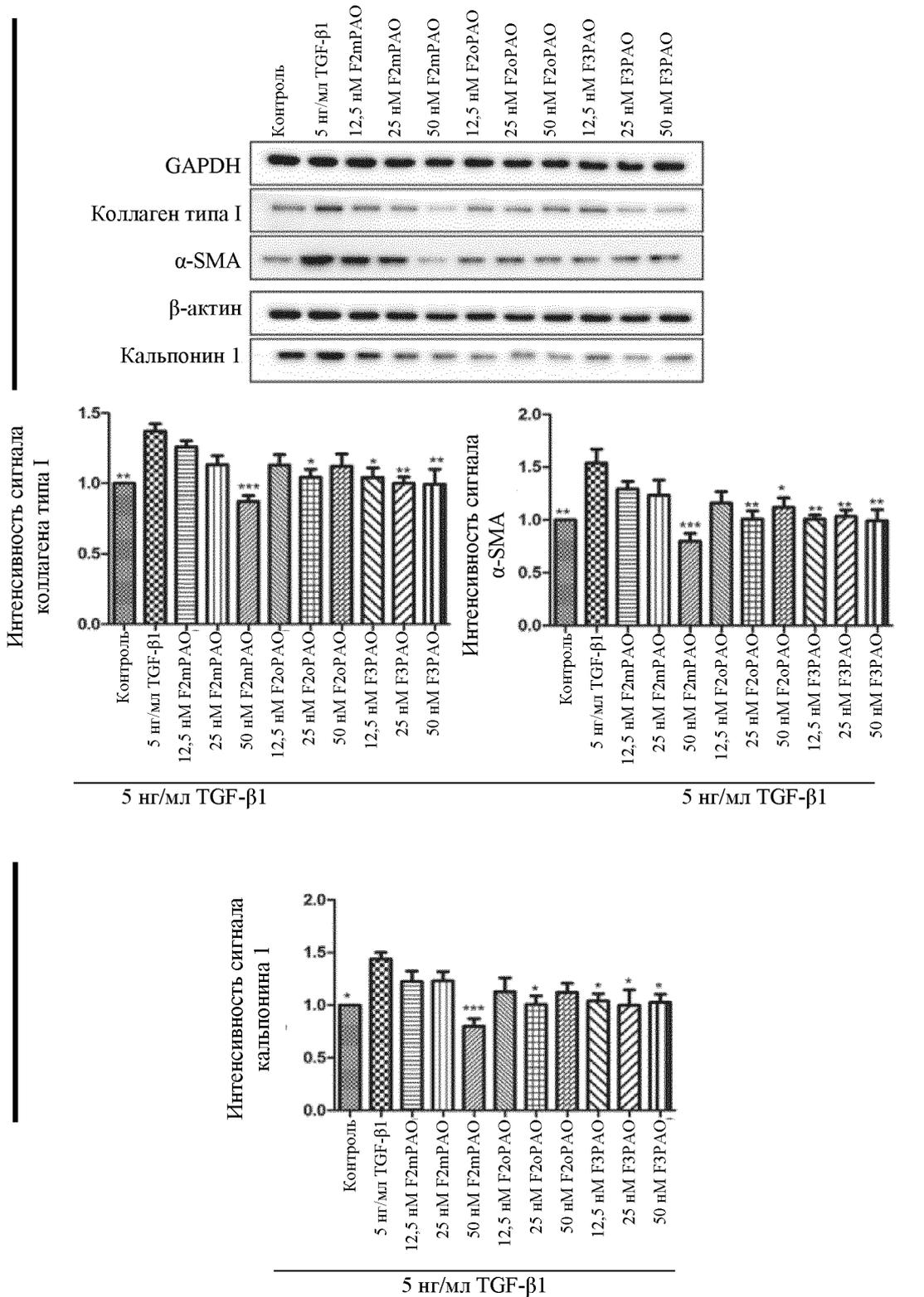
42. Аналитический способ по п. 40, где на стадии 1 PAO или его производное и контрольный стандарт растворяют в DMSO (диметилсульфоксид), раствор контрольного стандарта в DMSO разбавляют ацетонитрилом, и 2,3-димеркаптопропансульфонат натрия растворяют в чистой воде.

43. Аналитический способ по п. 40, где контрольный стандарт представляет собой толбутамид, и на стадии 3 продукт дериватизации PAO или его производного измеряют методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии.

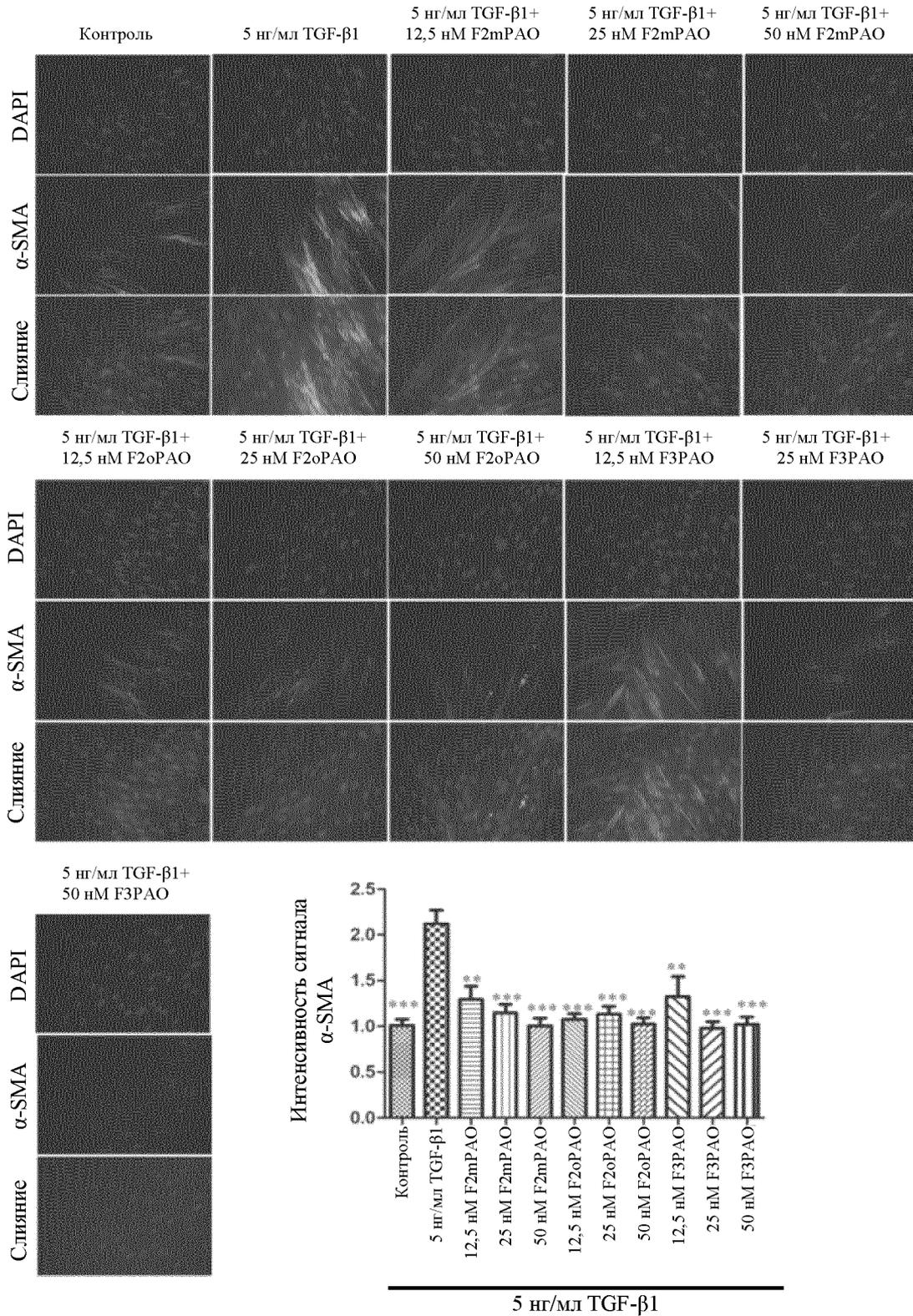
Средняя концентрация в крови при внутривенном введении**Фиг. 1****Средняя концентрация в крови при пероральном введении****Фиг. 2**



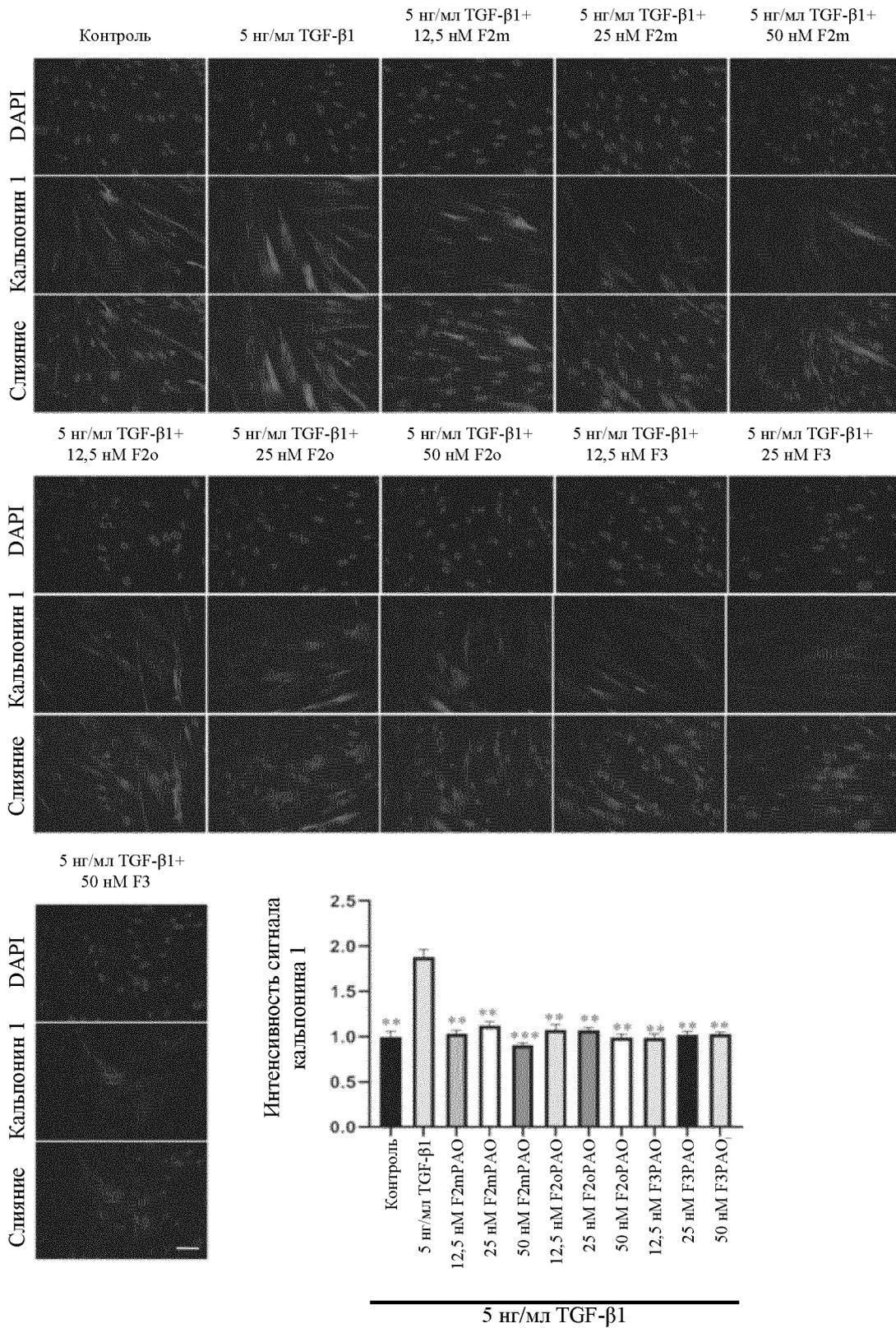
Фиг. 3

5 нг/мл TGF- β 1

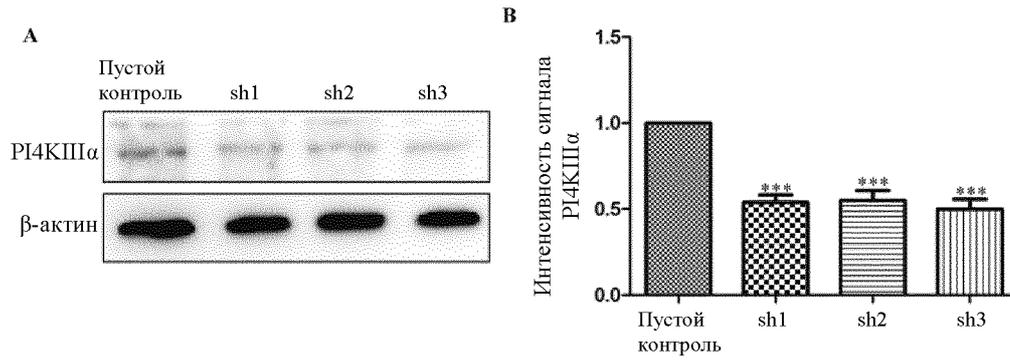
Фиг. 4



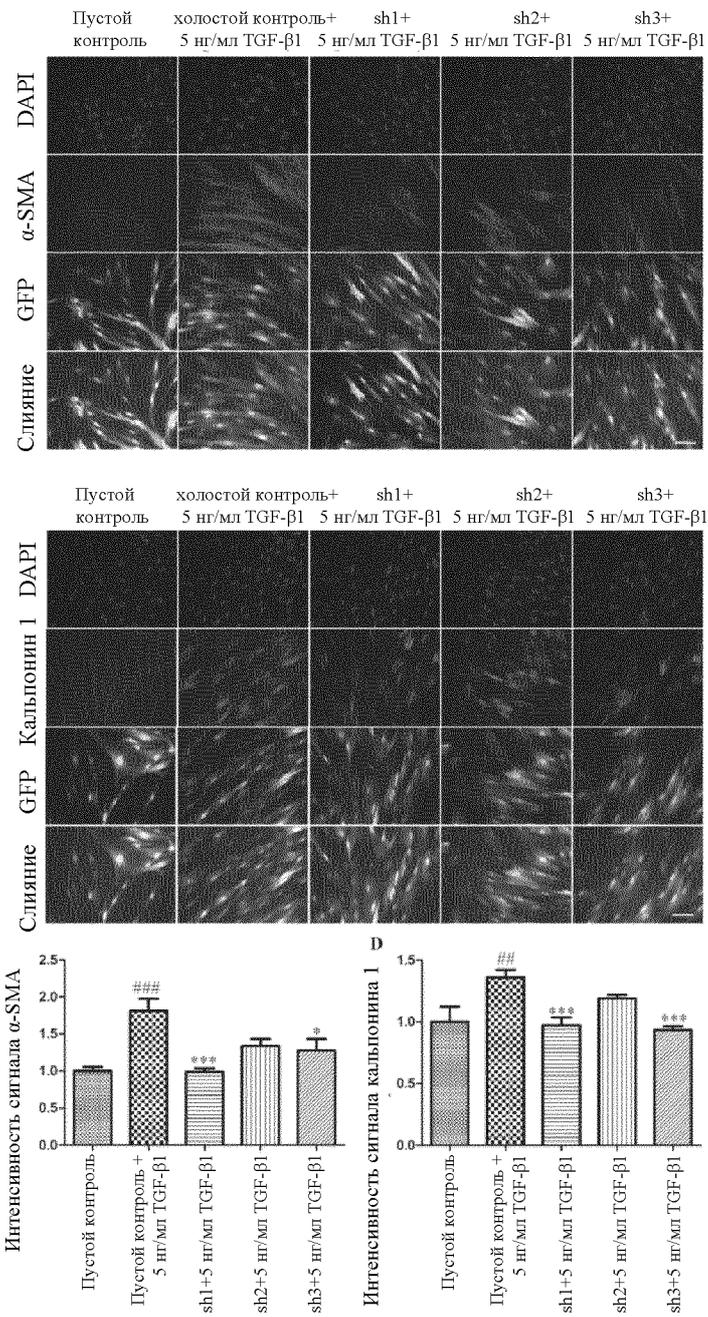
Фиг. 5



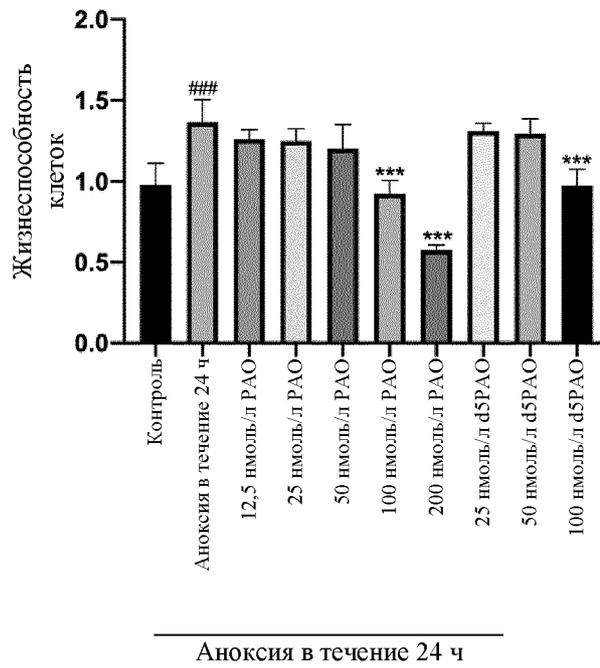
Фиг. 6



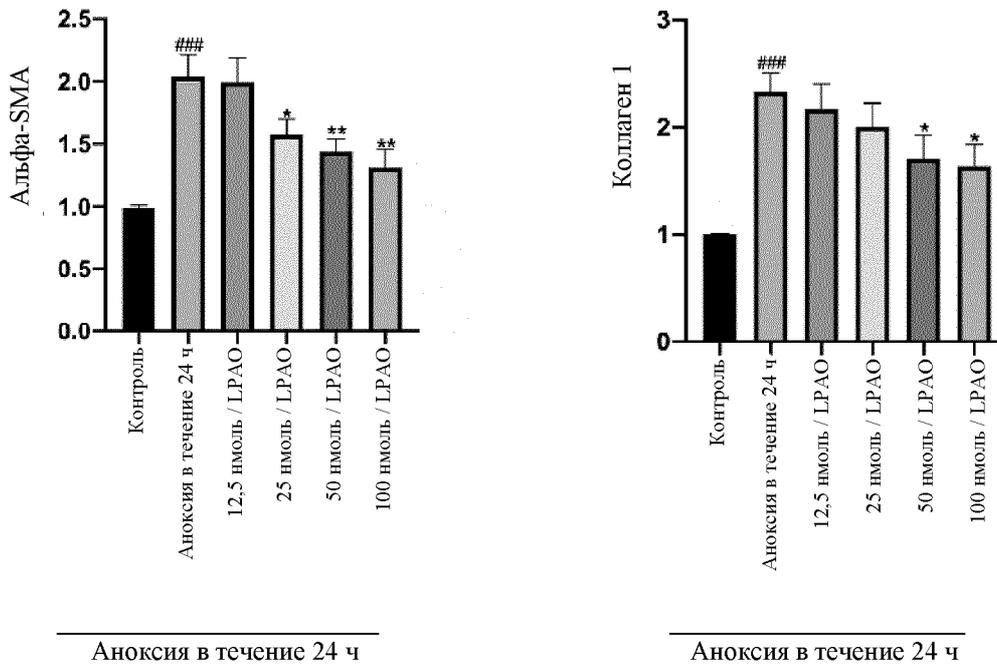
Фиг. 7



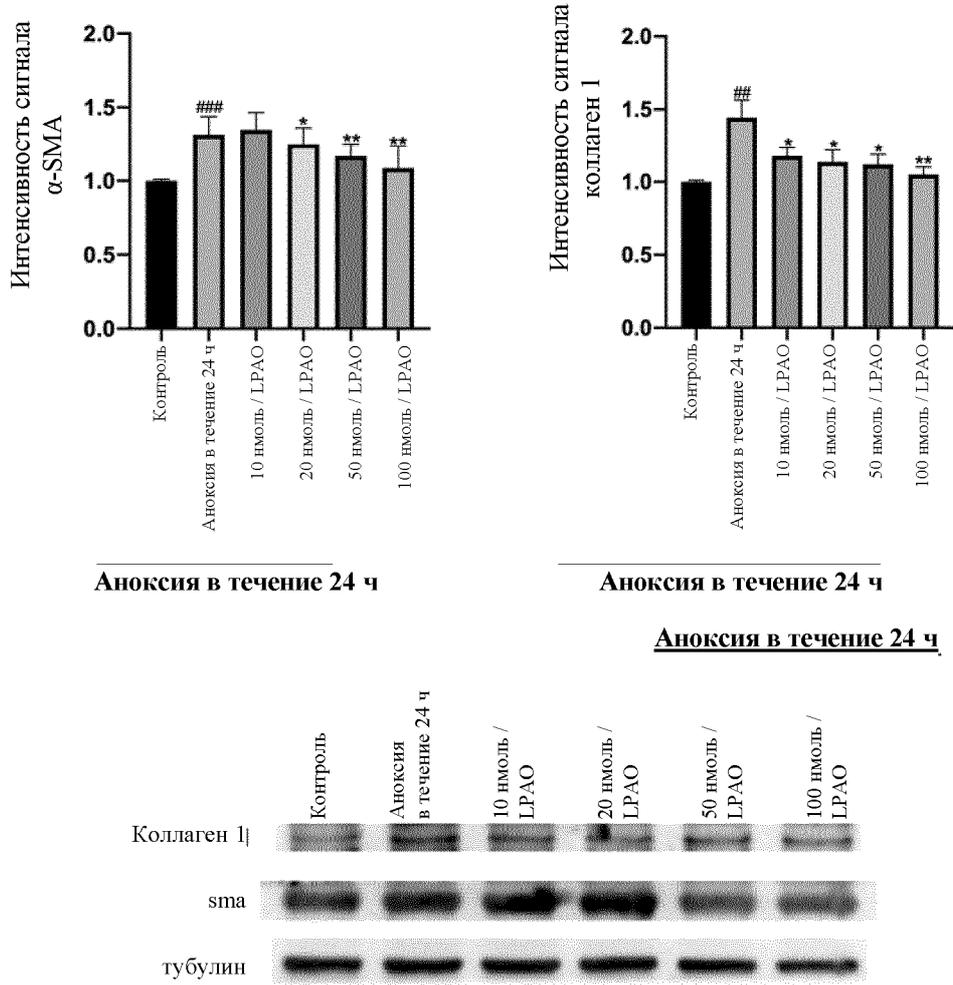
Фиг. 8



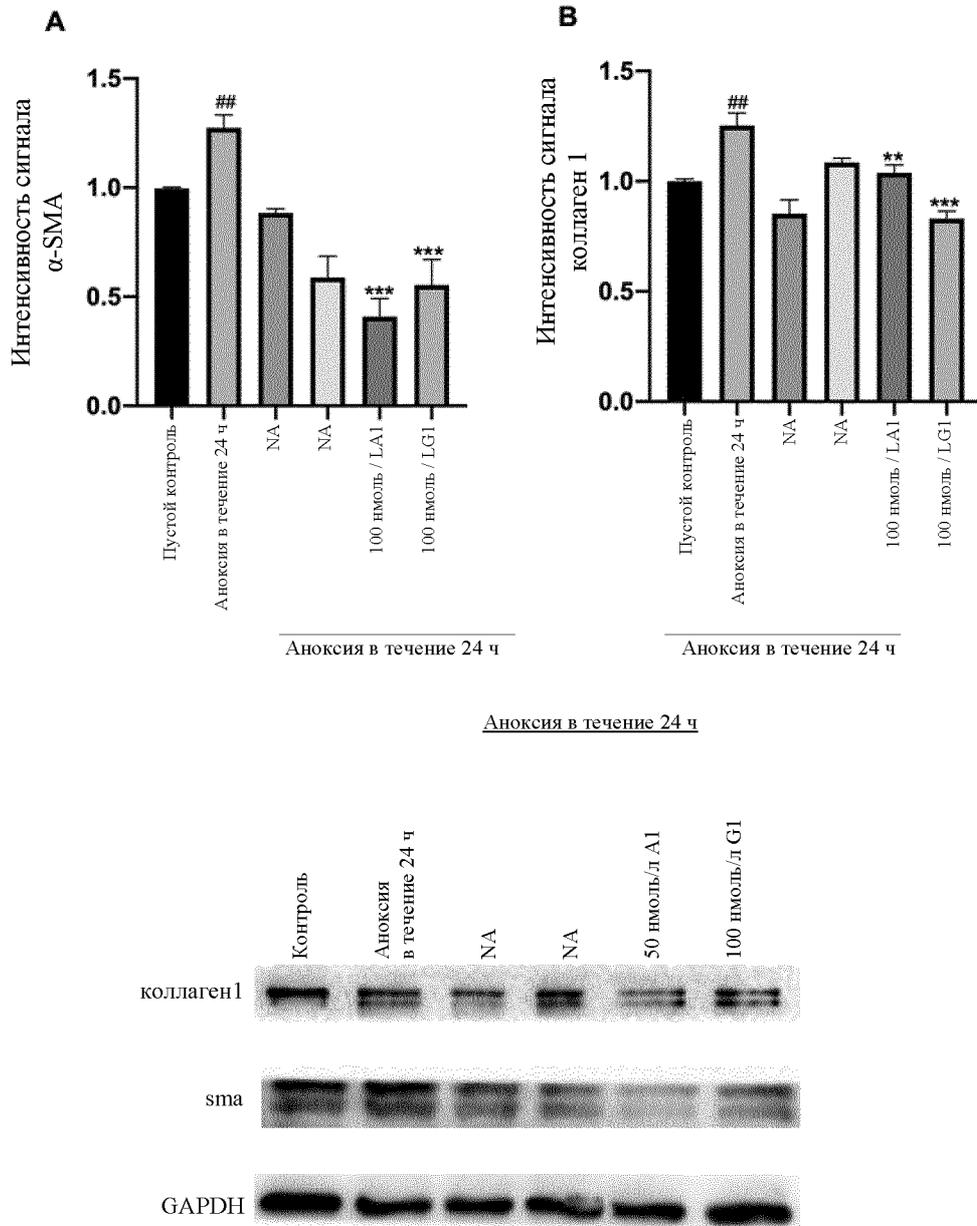
Фиг. 9



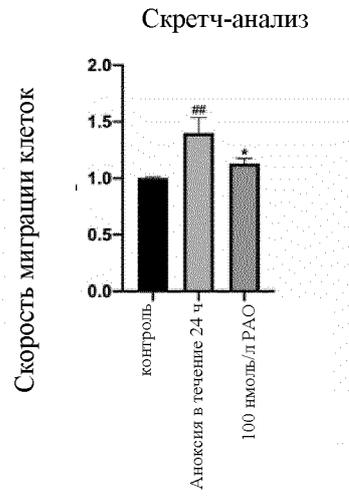
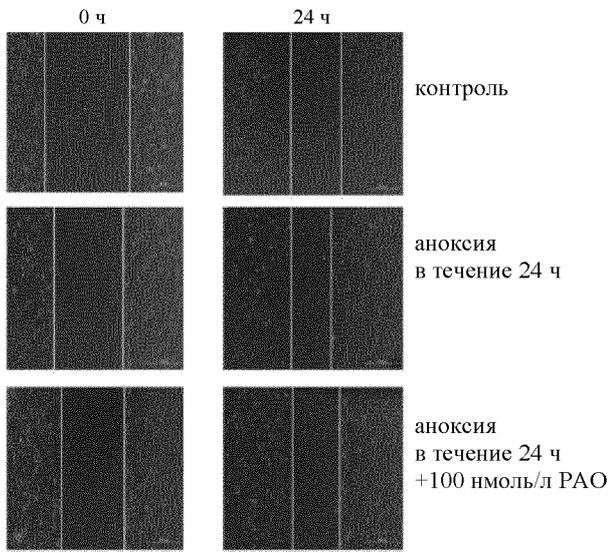
Фиг. 10



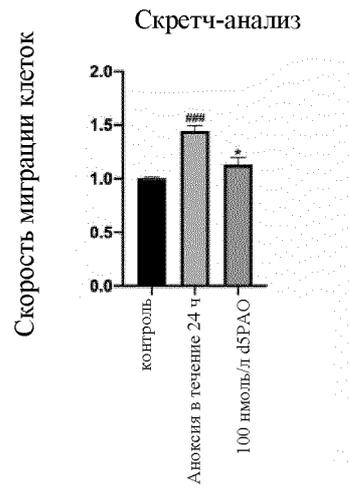
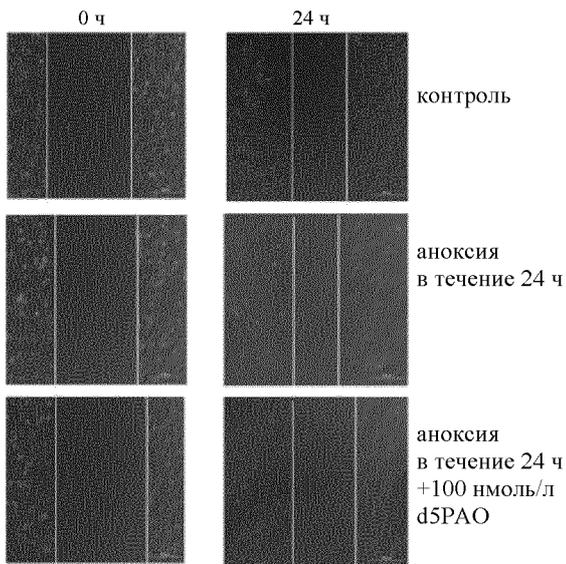
Фиг. 11



Фиг. 12

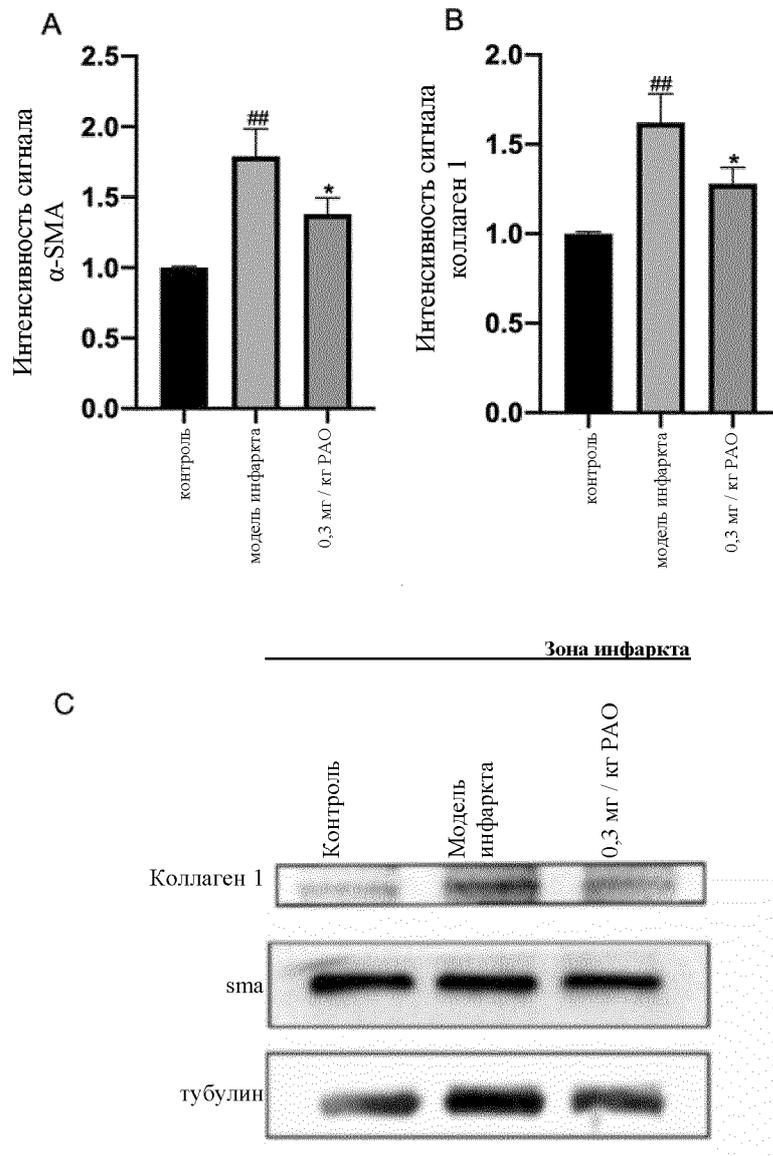


Аноксия в течение 24 ч

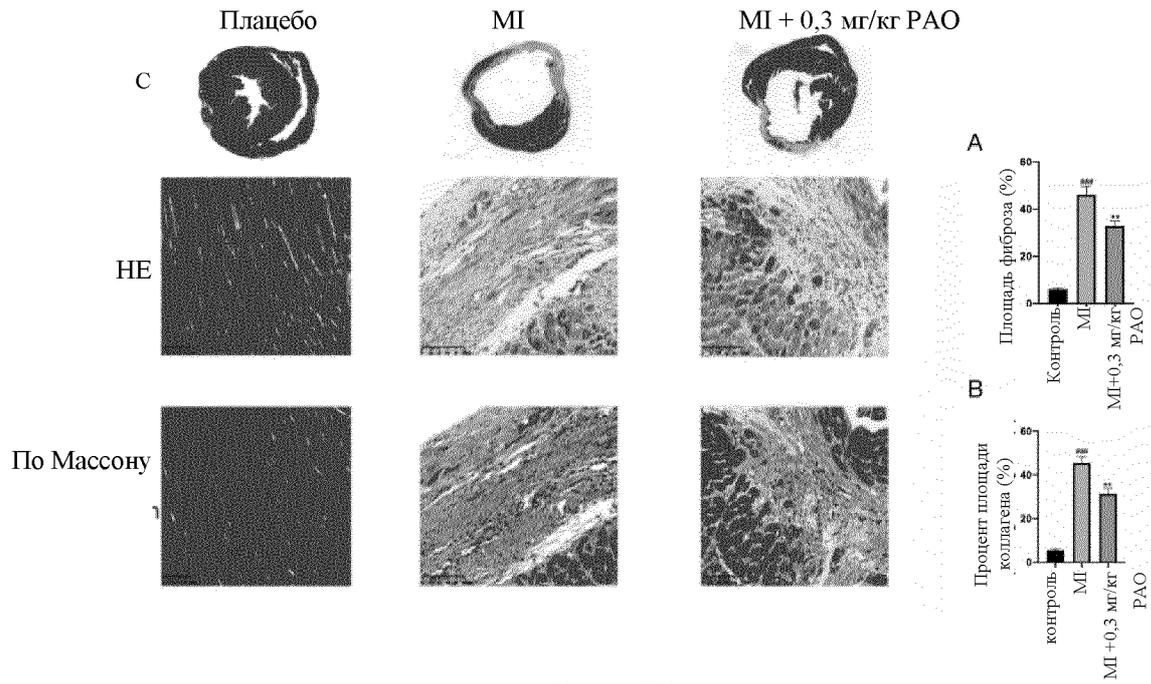


Аноксия в течение 24 ч

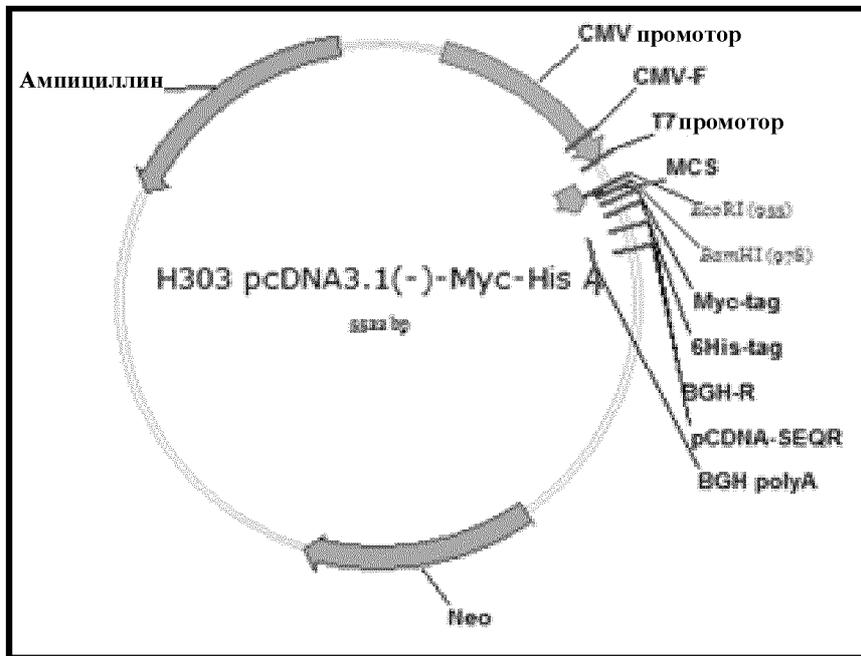
Фиг. 13



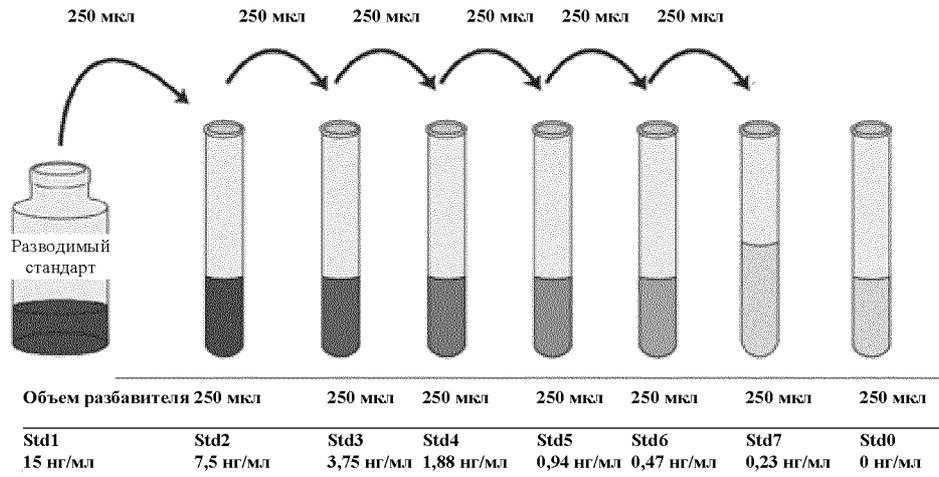
Фиг. 14



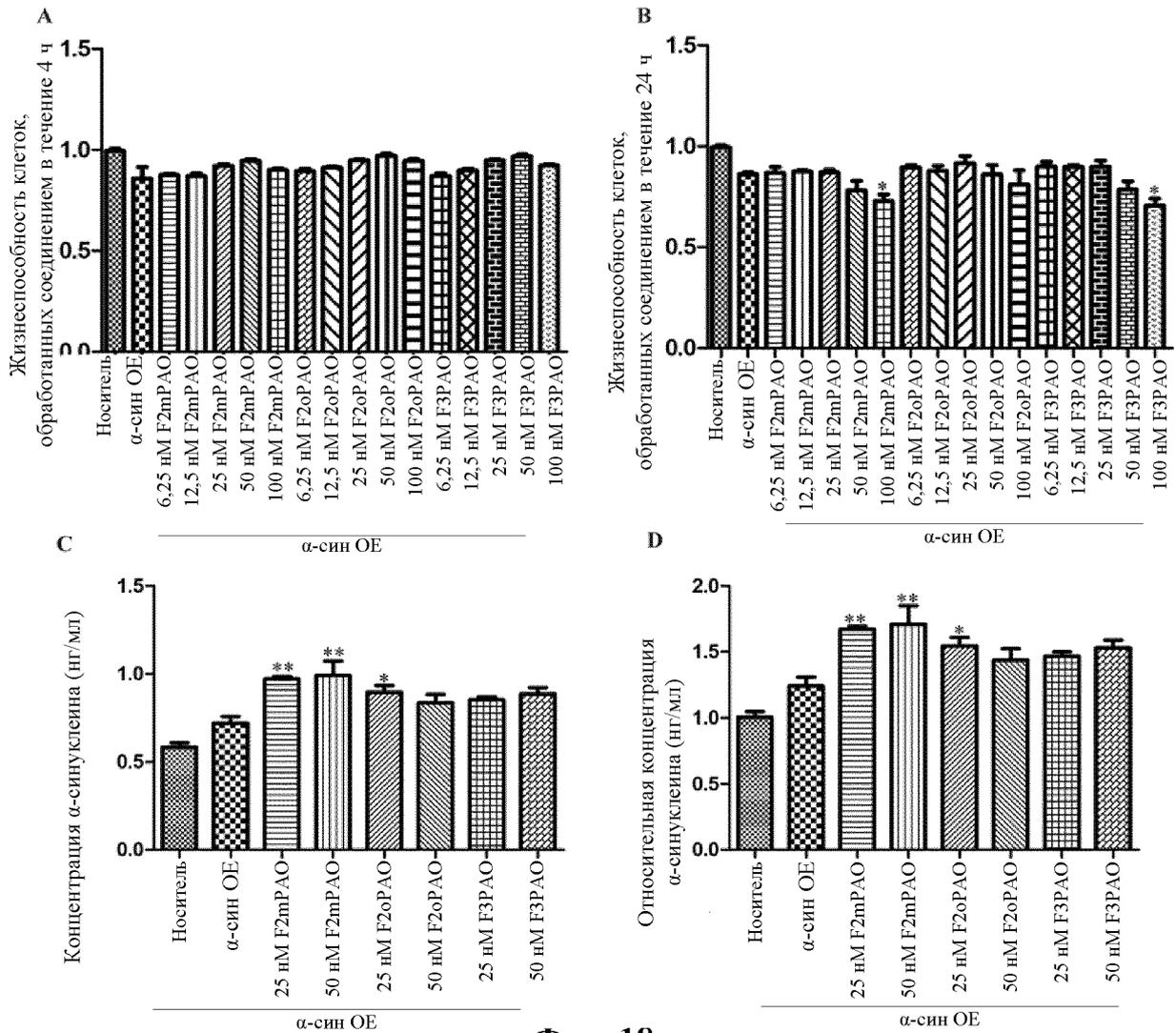
Фиг. 15



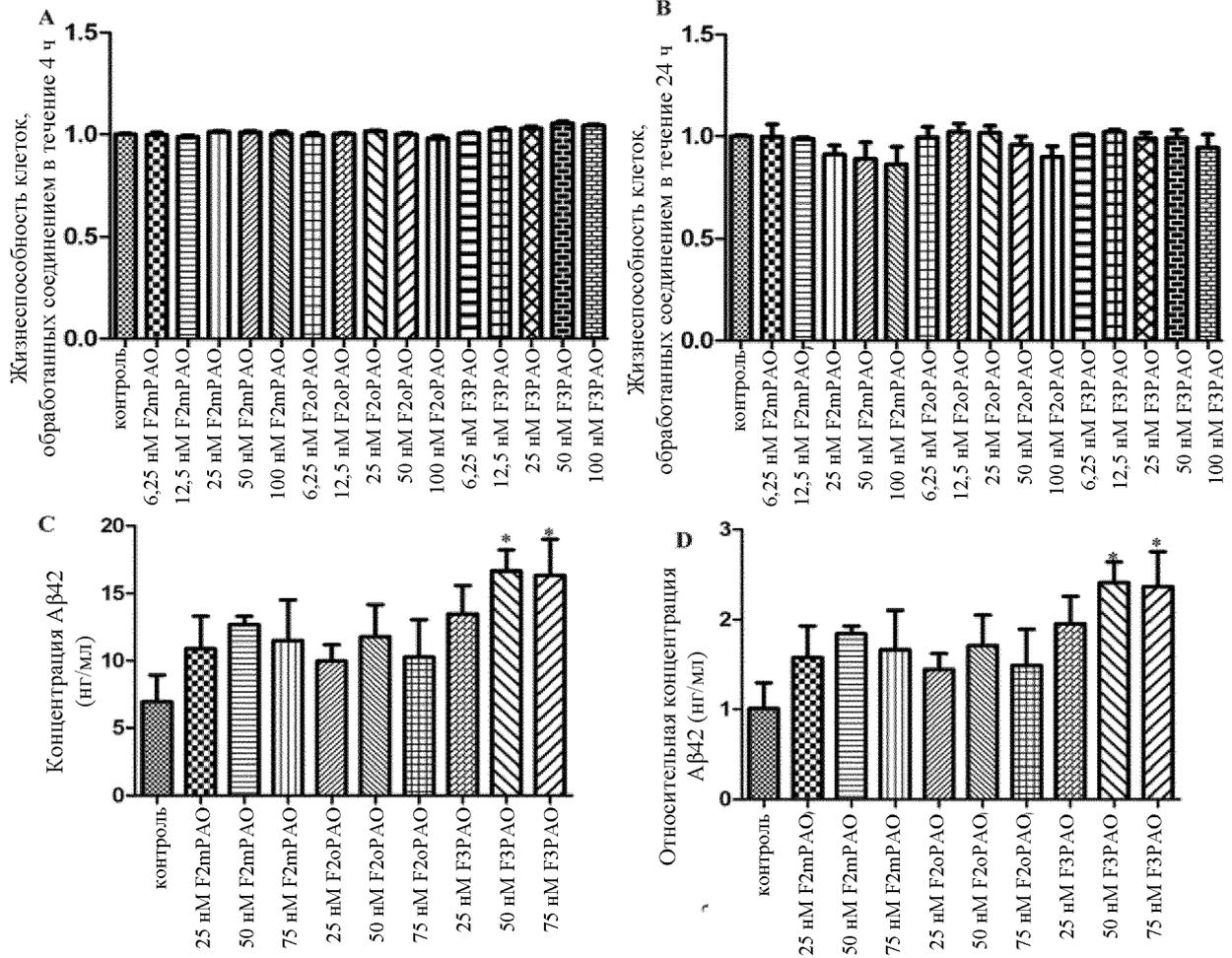
Фиг. 16



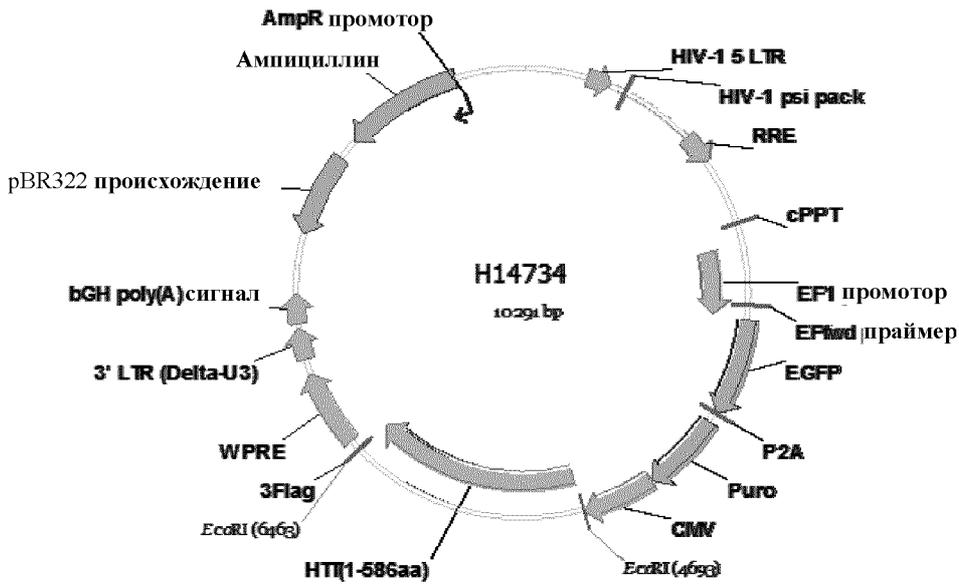
Фиг. 17



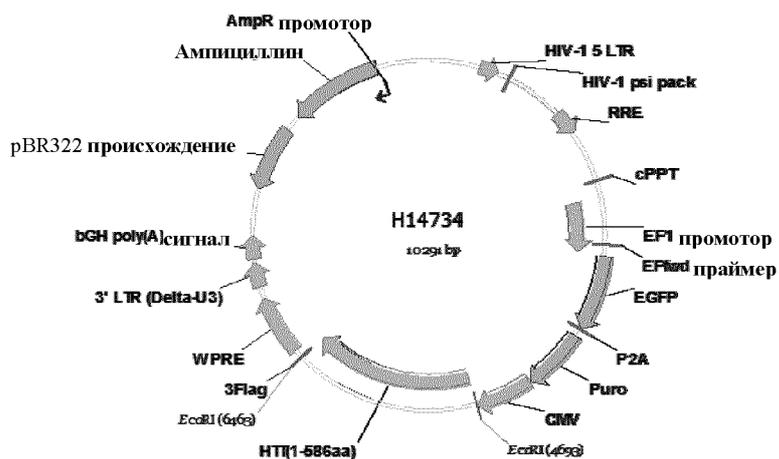
Фиг. 18



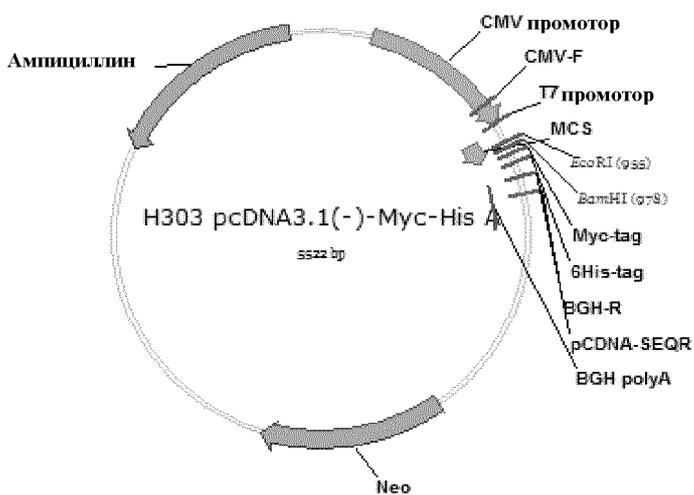
Фиг. 19



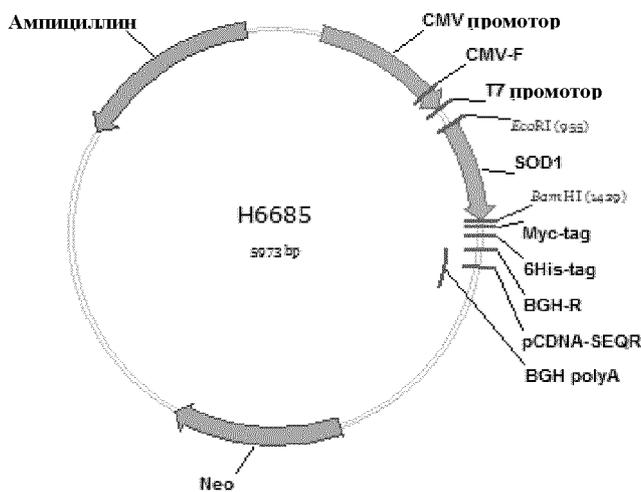
Фиг. 20



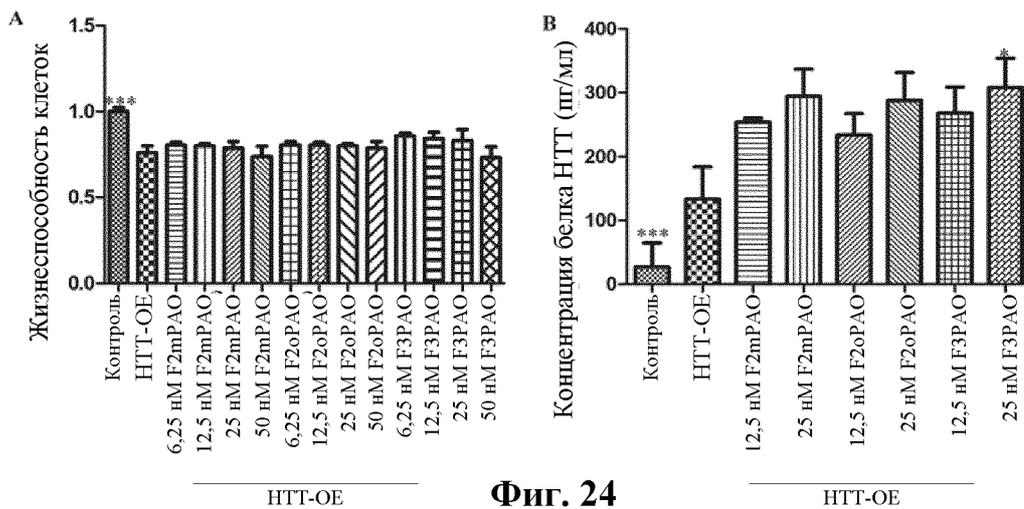
Фиг. 21



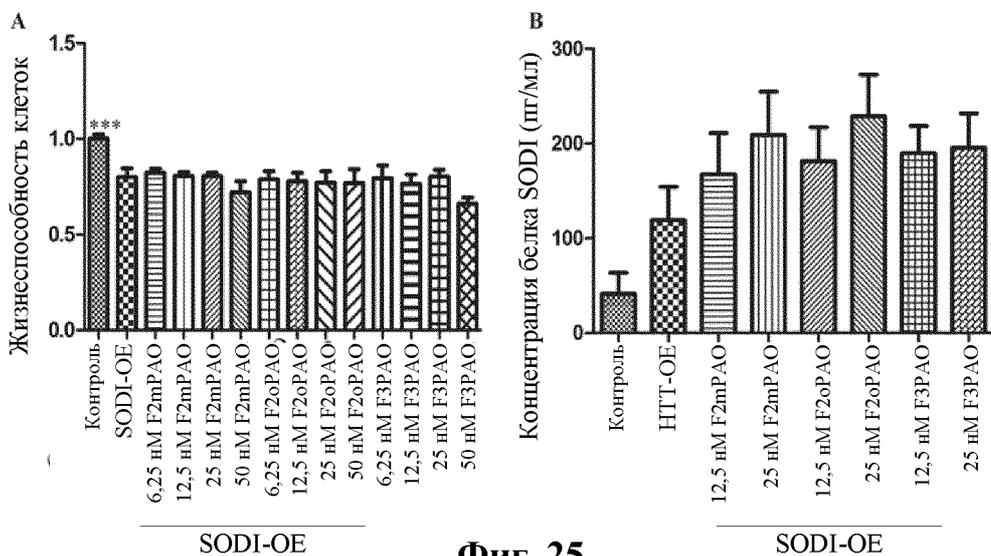
Фиг. 22



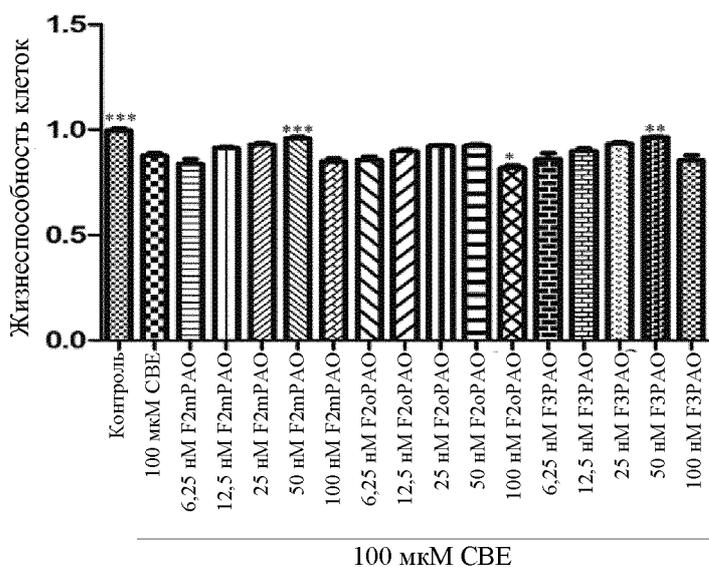
Фиг. 23



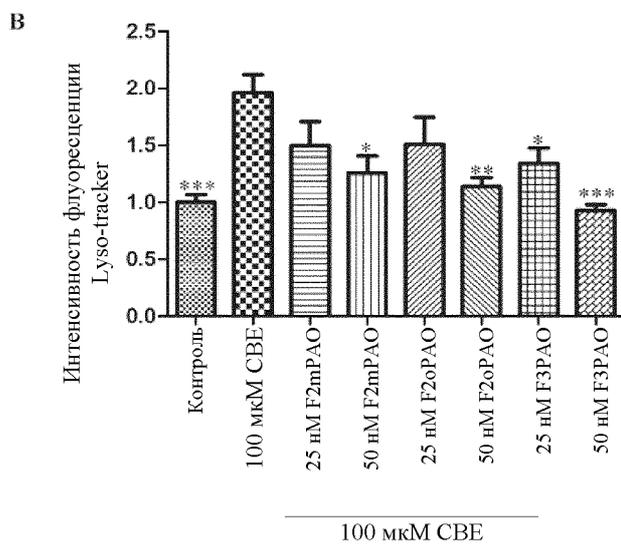
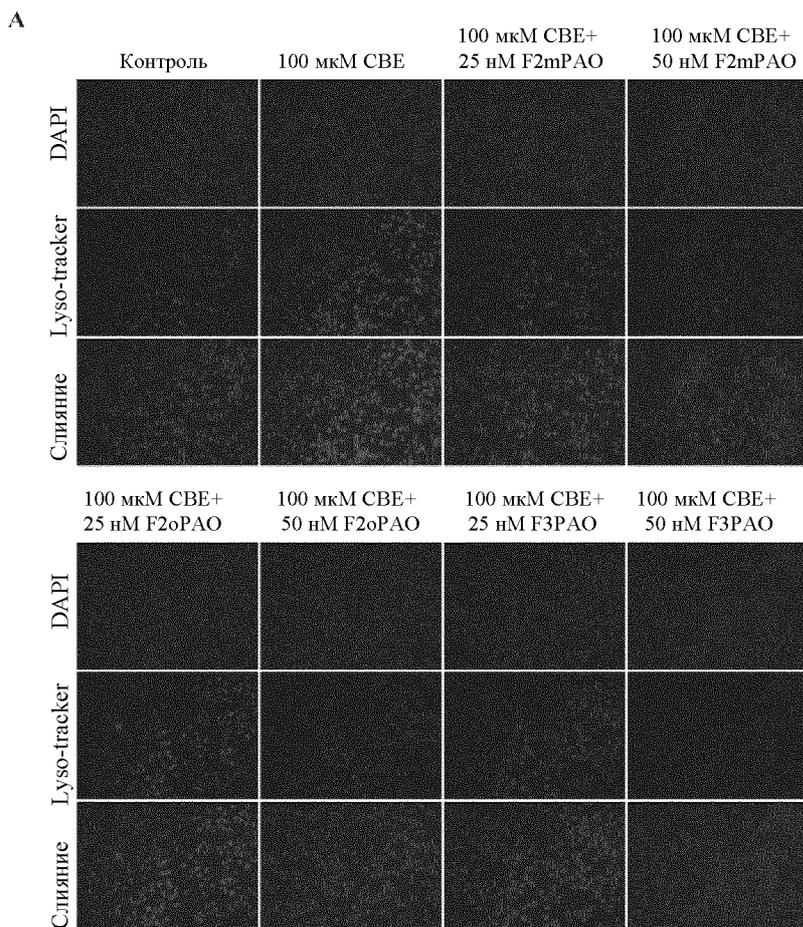
Фиг. 24



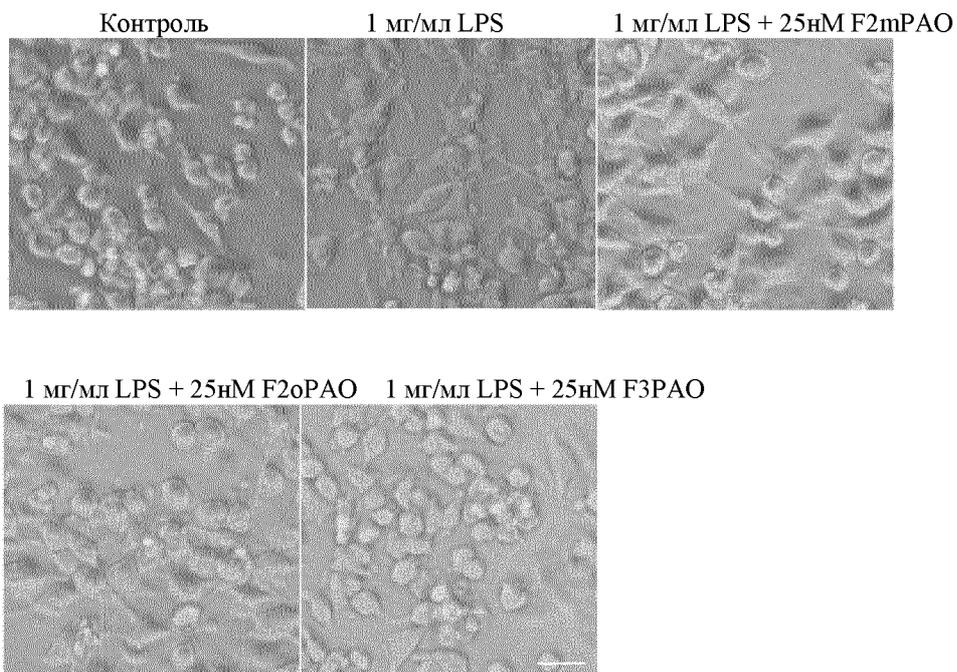
Фиг. 25



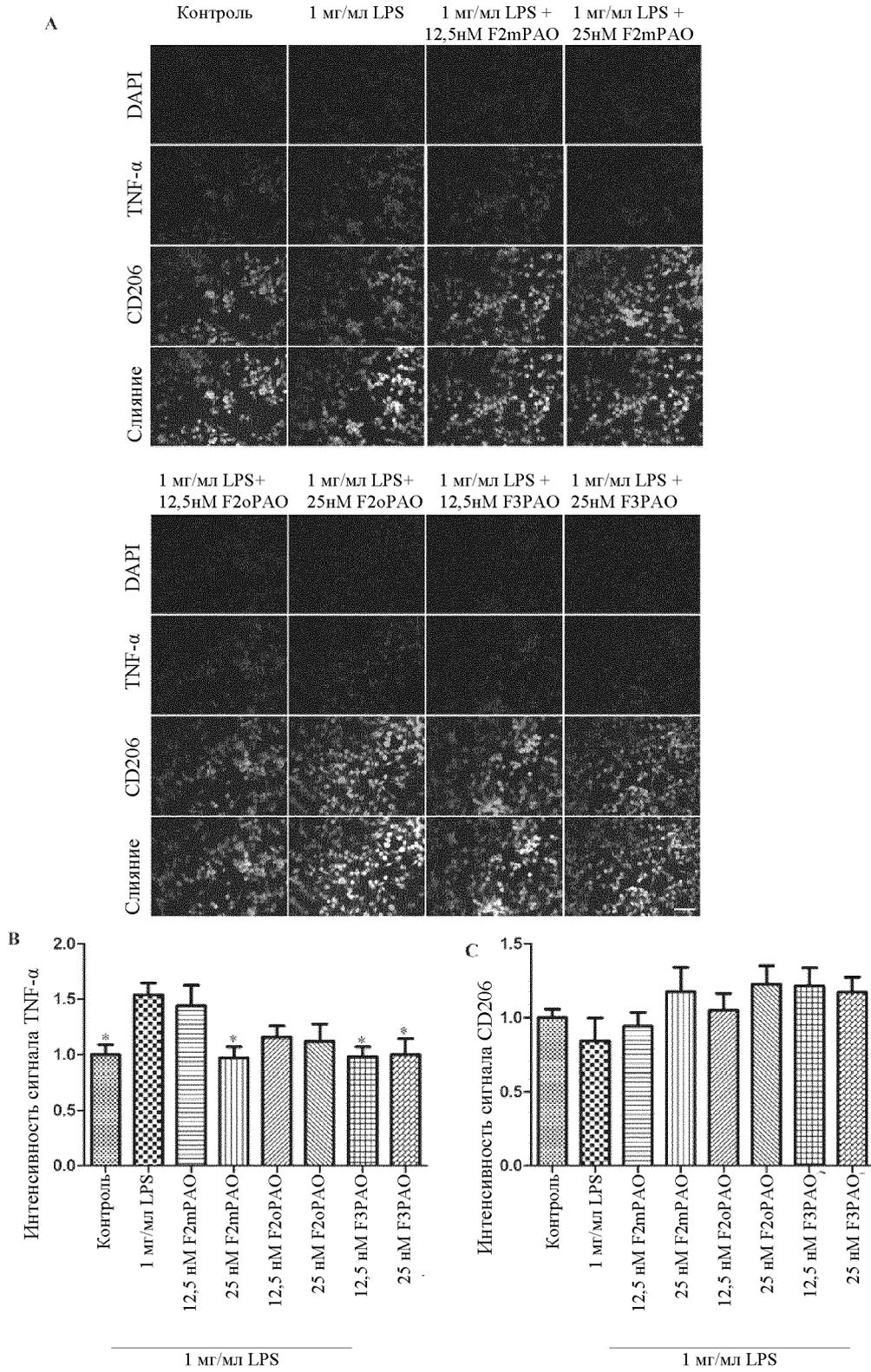
Фиг. 26



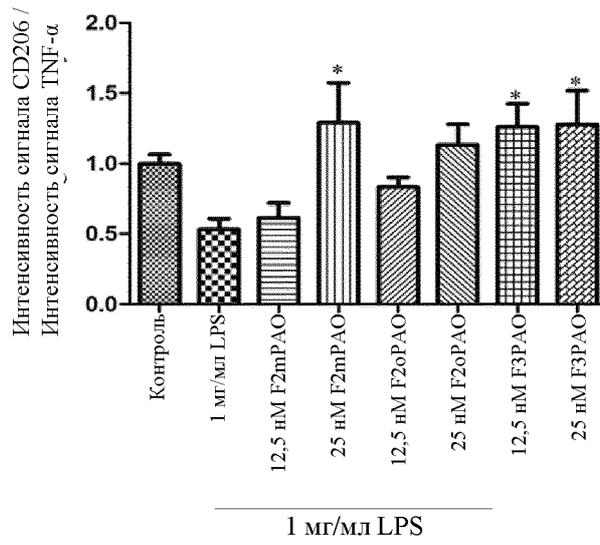
Фиг. 27



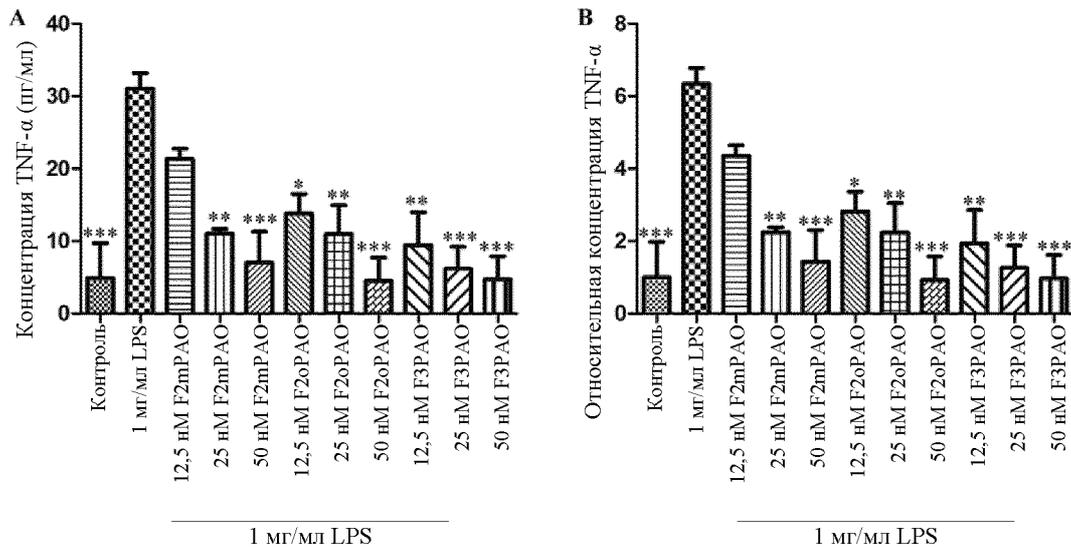
Фиг. 28



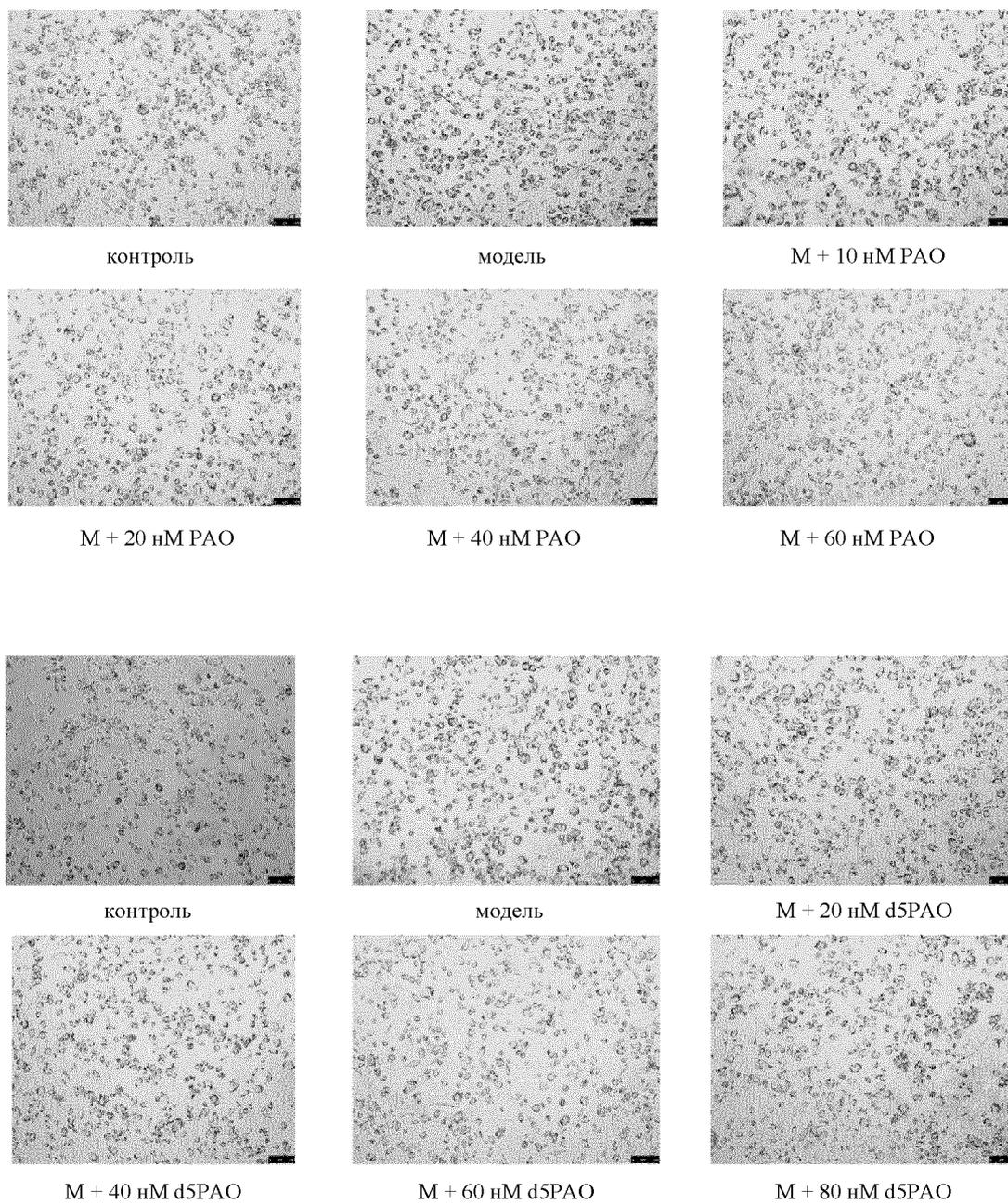
Фиг. 29

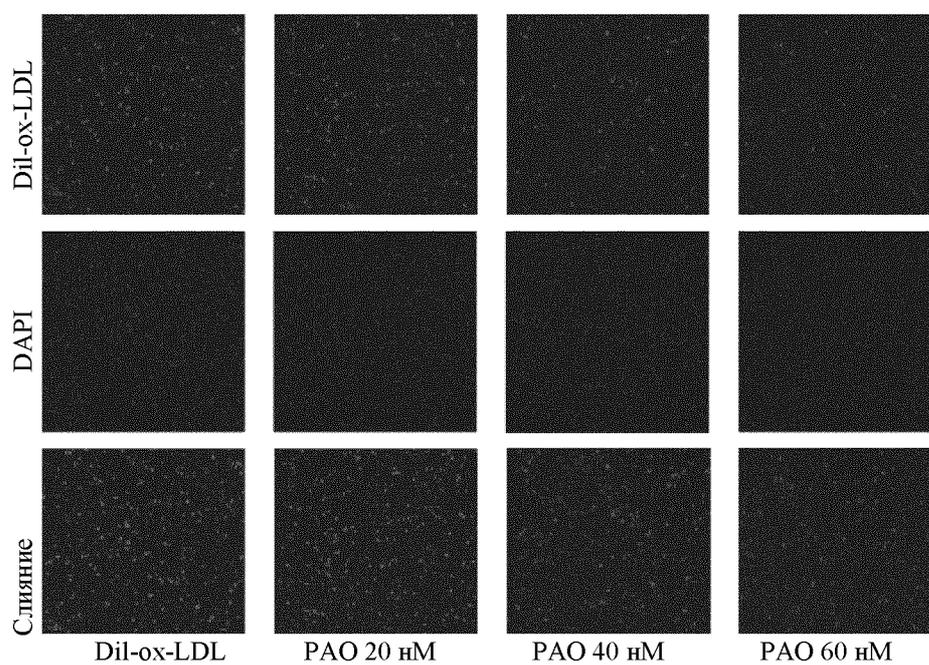


Фиг. 30

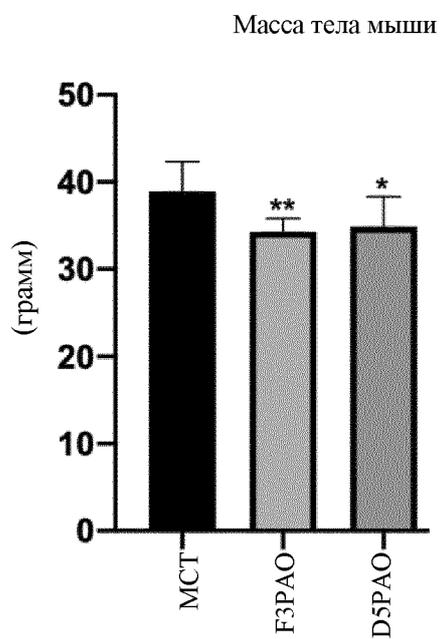


Фиг. 31

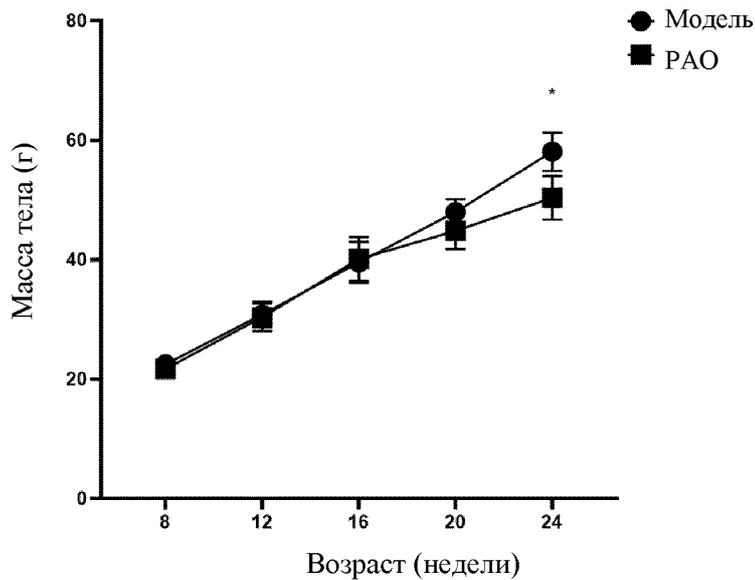
**Фиг. 32**



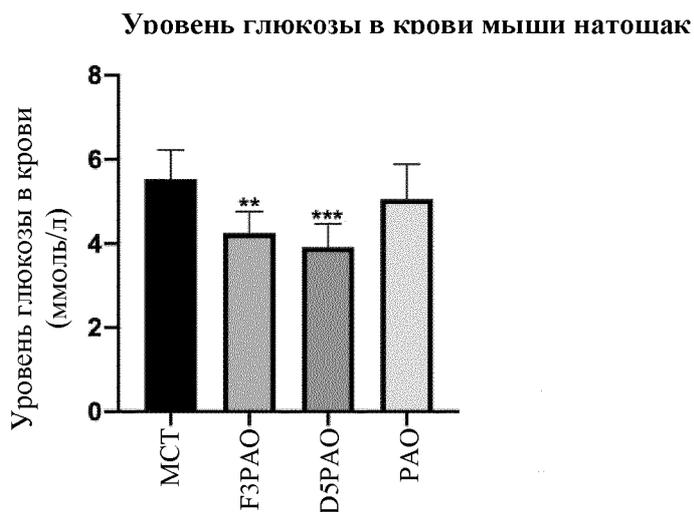
Фиг. 33



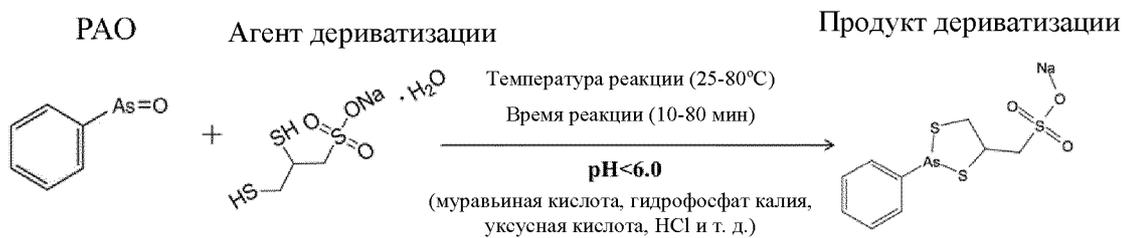
Фиг. 34



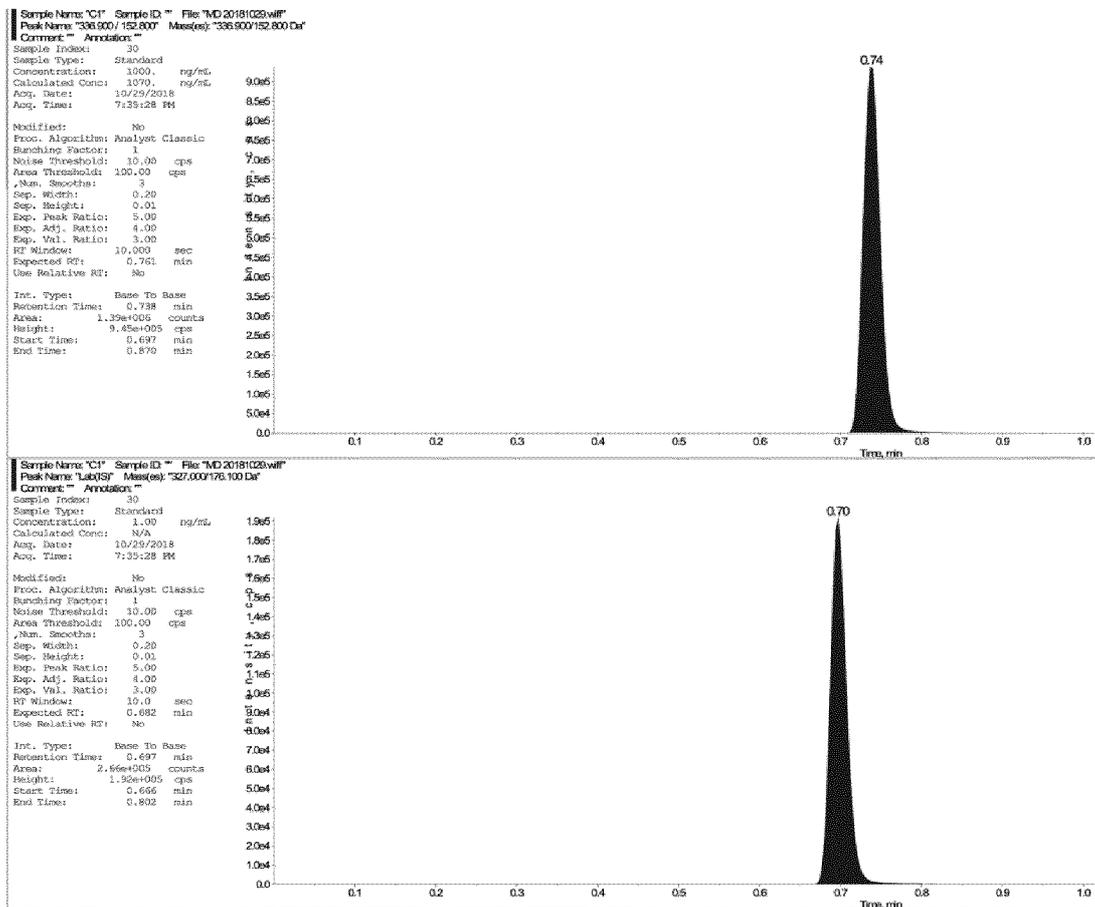
Фиг. 35



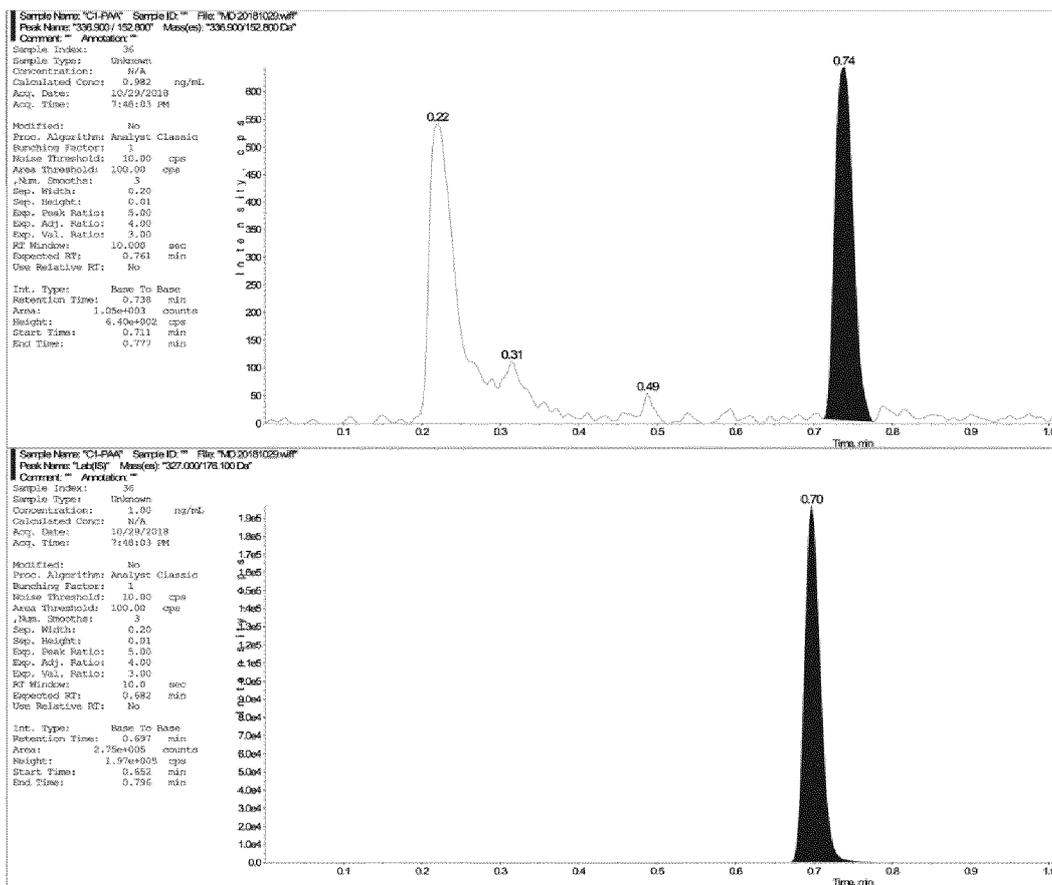
Фиг. 36



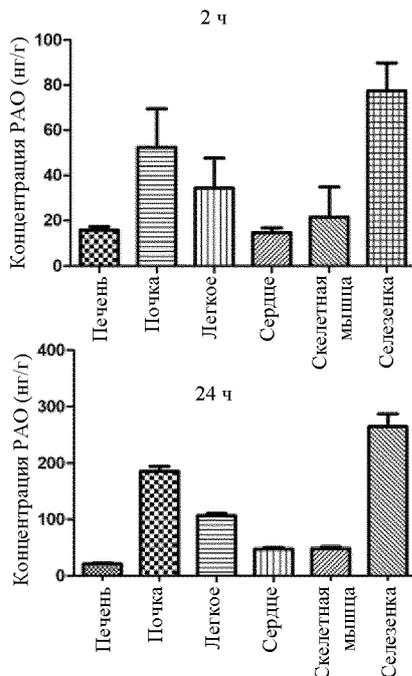
Фиг. 37



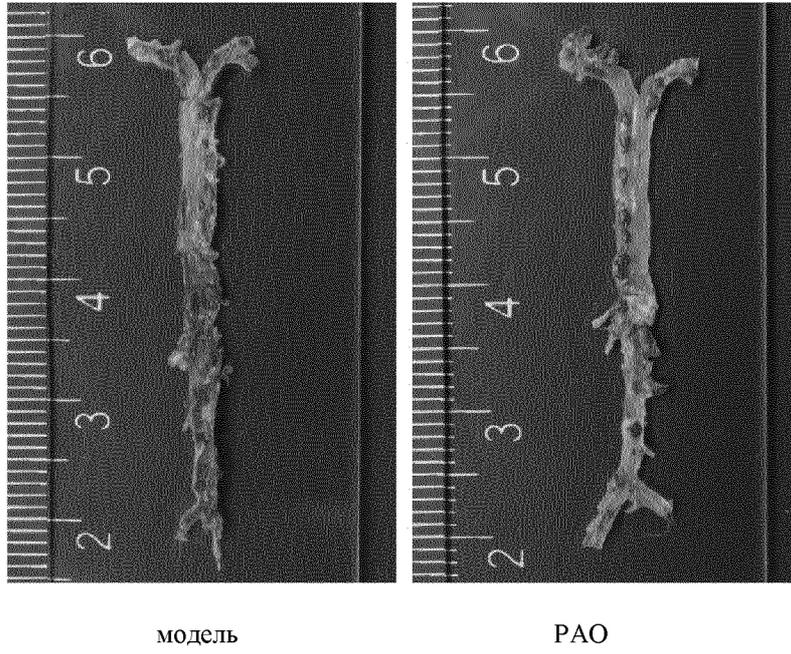
Фиг. 38



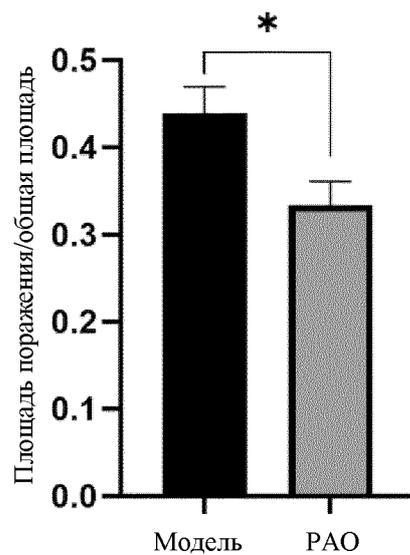
Фиг. 39



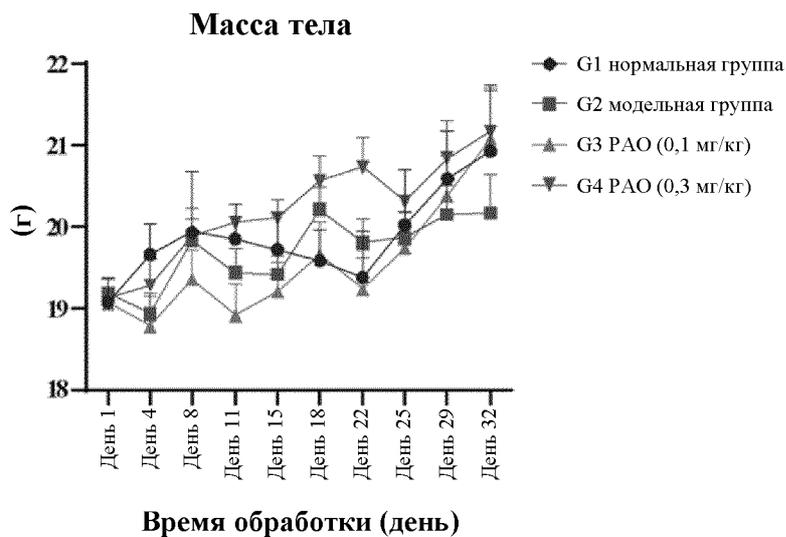
Фиг. 40



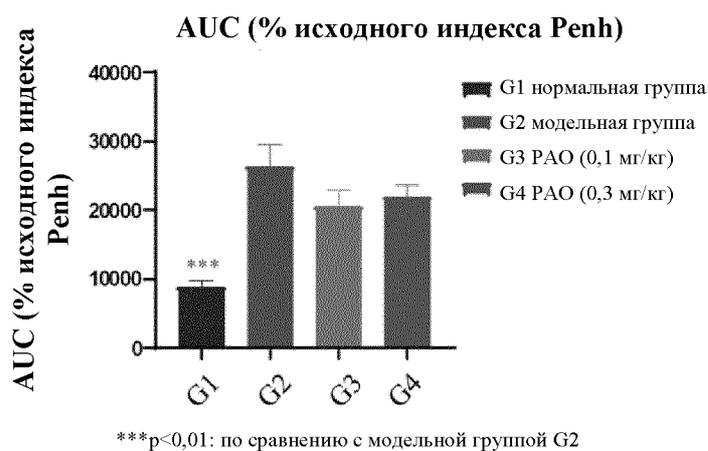
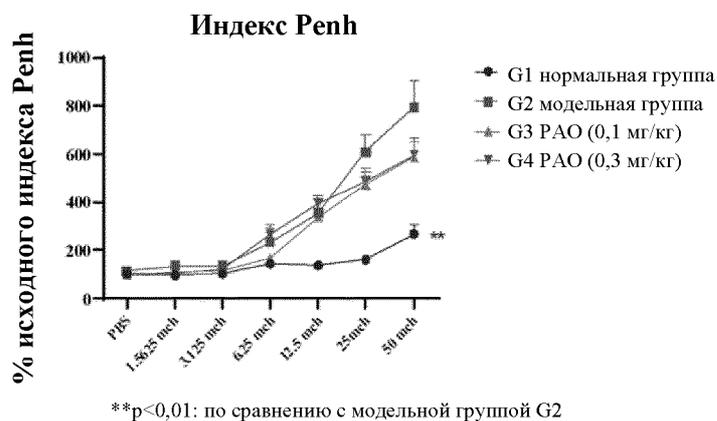
Фиг. 41



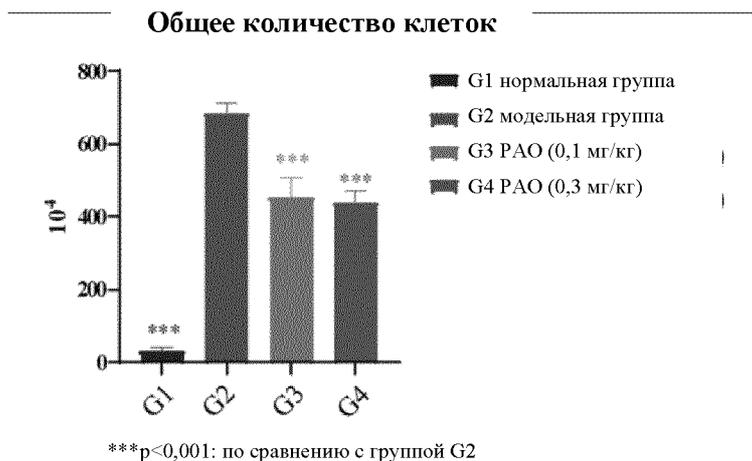
Фиг. 42



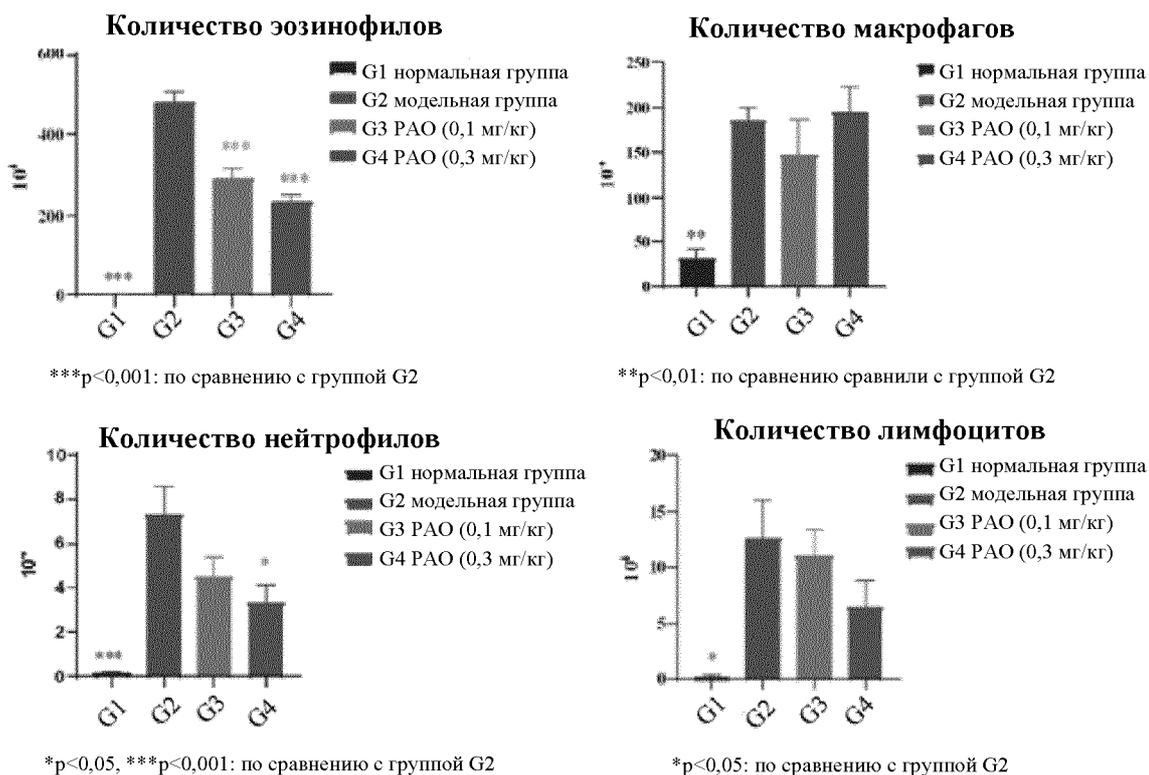
Фиг. 43



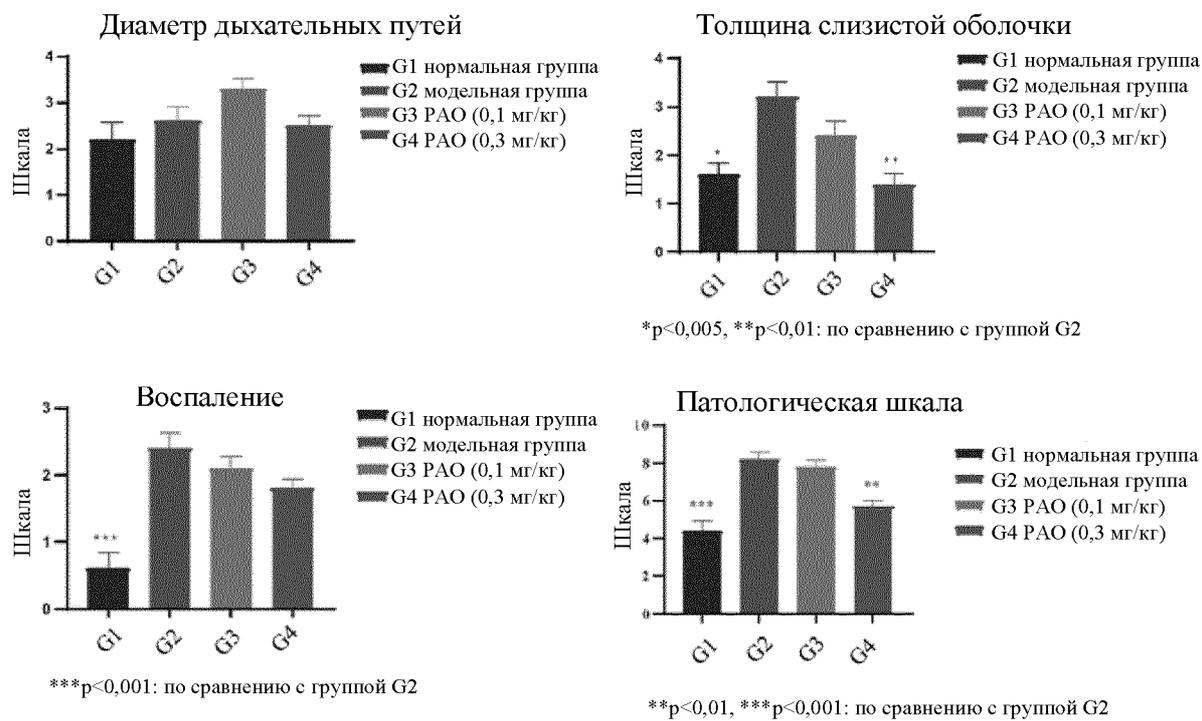
Фиг. 44



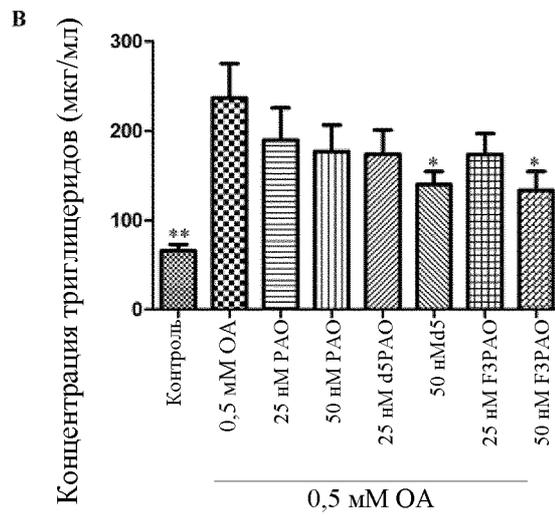
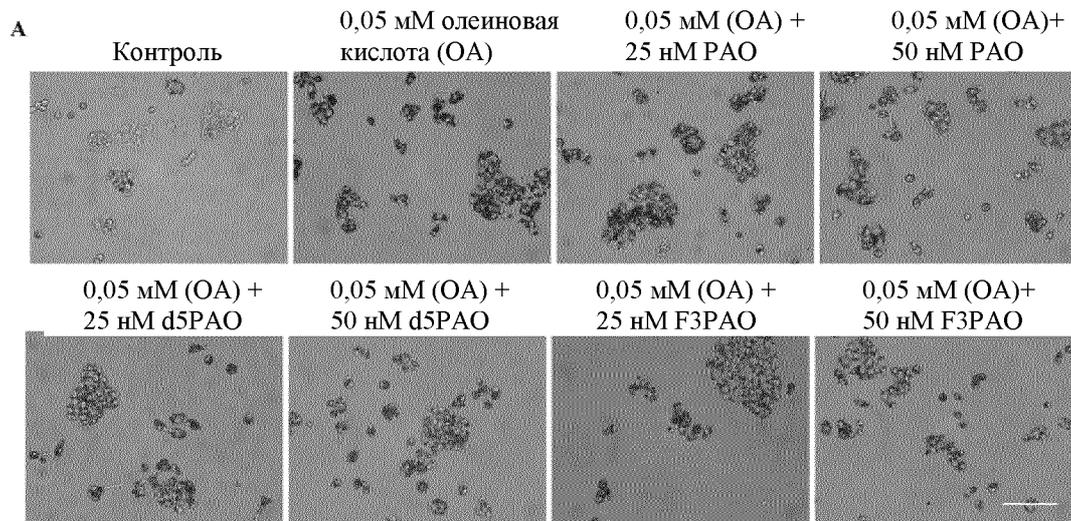
Фиг. 45



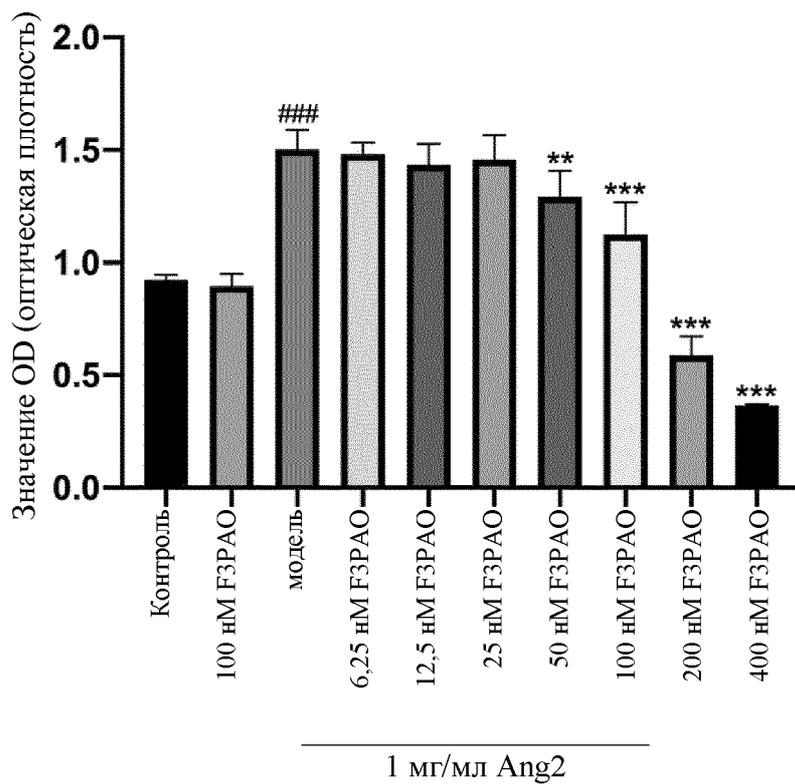
Фиг. 46



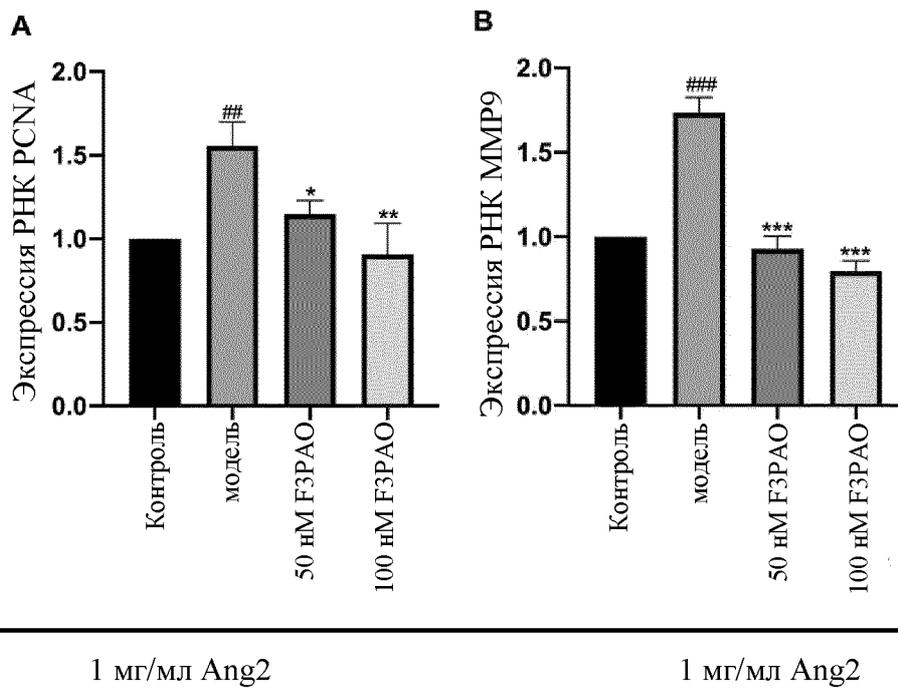
Фиг. 47



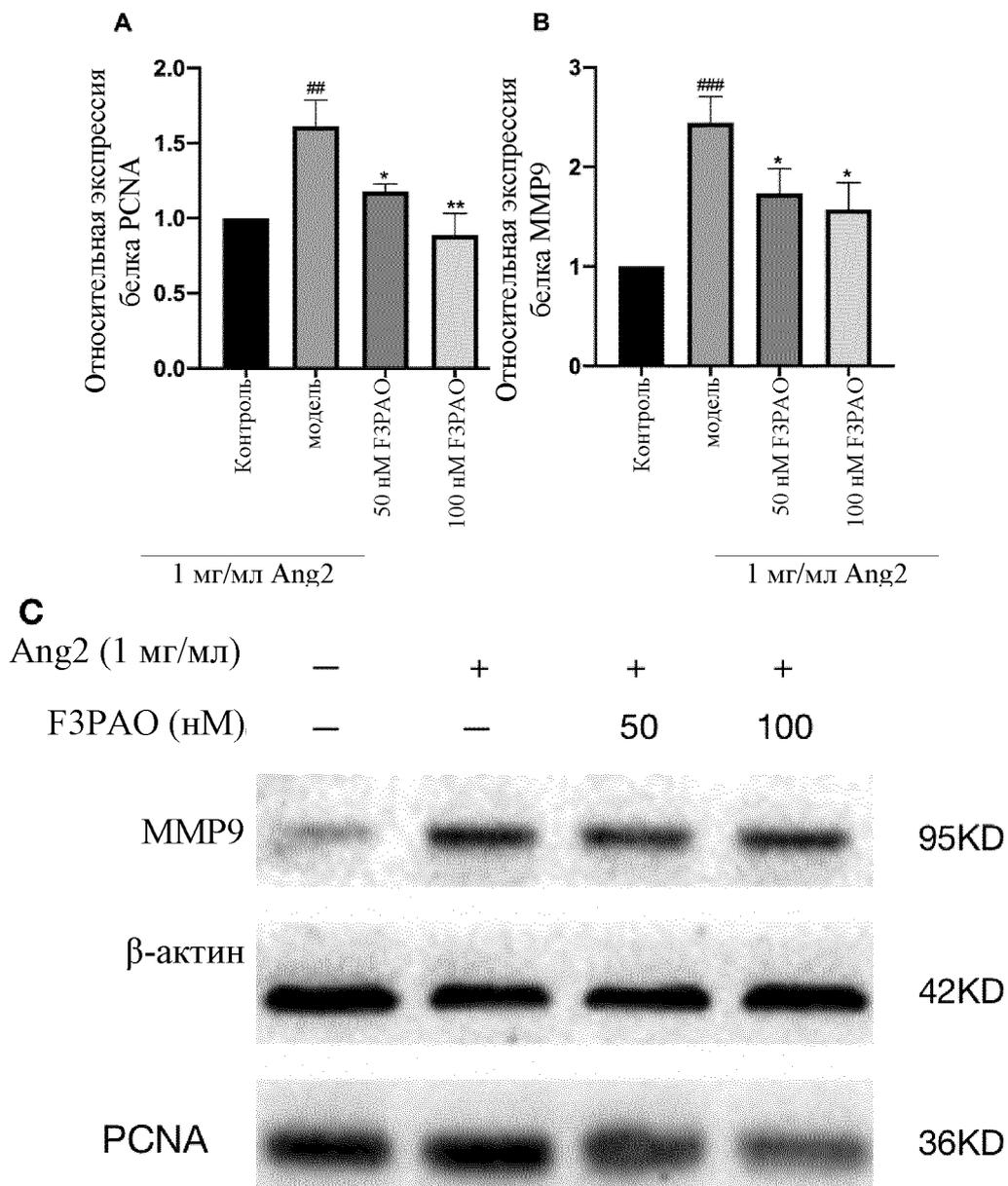
Фиг. 48



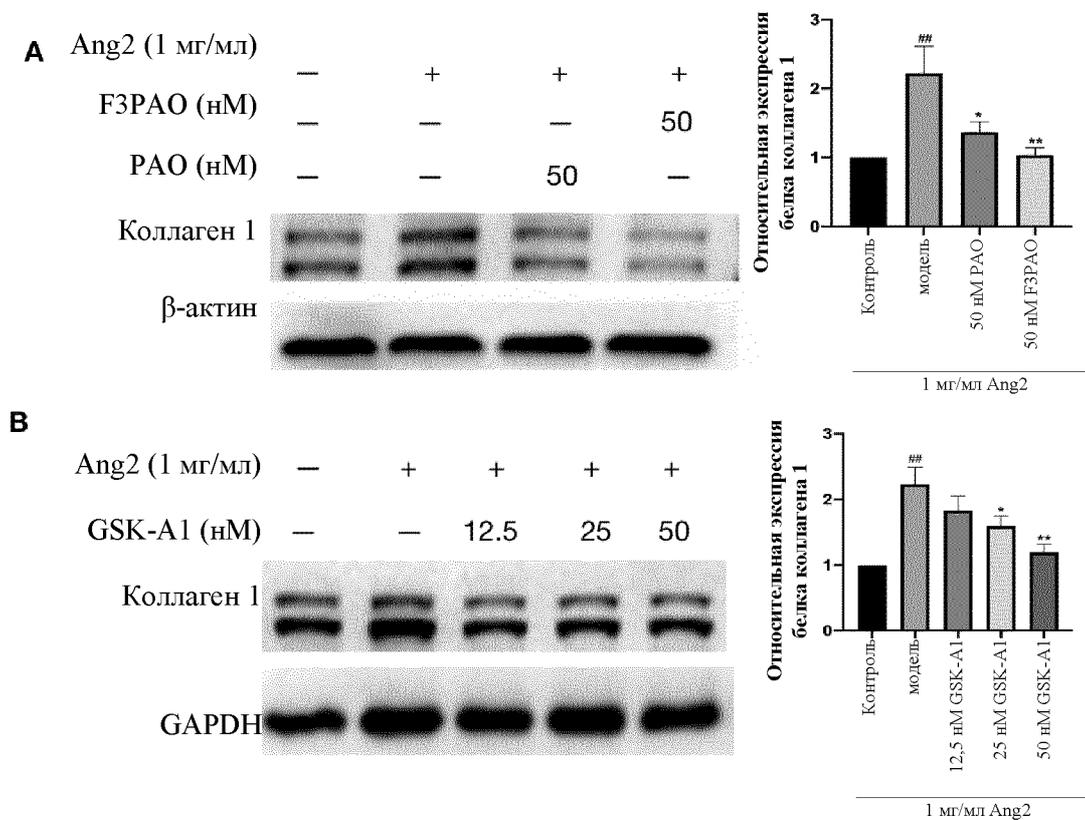
Фиг. 49



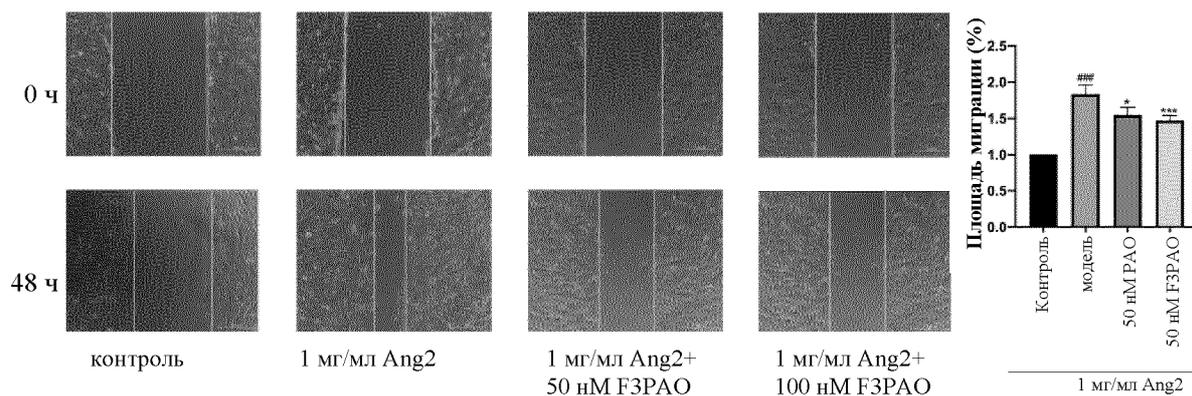
Фиг. 50



Фиг. 51



Фиг. 52



Фиг. 53