



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК  
**A61K 31/4425** (2006.01)  
**A61K 31/444** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 9/12** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 1/04** (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009135821/15, 25.02.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.02.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
28.02.2007 PL P-381862

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2011 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 10.03.2013 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 2006/024545 A1, 09.03.2006. US  
2006292252 A1, 28.12.2006. WO 2005067927 A2,  
28.07.2005.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 28.09.2009(86) Заявка РСТ:  
IB 2008/050666 (25.02.2008)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2008/104920 (04.09.2008)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спаская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364

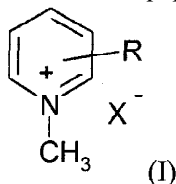
(72) Автор(ы):

**ГЕБИЦКИЙ Ежи (PL),  
МАРЦИНЕК Анджей (PL),  
ХЛОПИЦКИЙ Стефан (PL),  
АДАМУС Ян (PL)**

(73) Патентообладатель(и):

**ХЕПЕНДО СП. З.О.О. (PL)**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПИРИДИНИЯ ДЛЯ  
ВАЗОПРОТЕКЦИИ И/ИЛИ ГЕПАТОПРОТЕКЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению  
соединения формулы (I):где R представляет собой атом водорода  
или CH<sub>3</sub>, а X представляет собой  
физиологически приемлемый противоион для  
получения гепатопротективного средства длялечения или предотвращения поражения  
печени. Изобретение также относится к  
способу лечения или предотвращения  
поражения печени, который включает введение  
терапевтически или профилактически  
эффективного количества указанного выше  
соединения формулы (I). Изобретение  
обеспечивает гепатопротективную активность  
за счет способности соединений формулы (I)  
улучшать функцию эндотелия стимуляцией  
высвобождения эндогенного простаглицлина. 2  
н. и 12 з.п. ф-лы, 7 ил., 3 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

**A61K 31/4425** (2006.01)**A61K 31/444** (2006.01)**A61P 9/10** (2006.01)**A61P 9/12** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)**A61P 1/16** (2006.01)**A61P 1/04** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009135821/15, 25.02.2008**(24) Effective date for property rights:  
**25.02.2008**

Priority:

(30) Convention priority:  
**28.02.2007 PL P-381862**(43) Application published: **10.04.2011 Bull. 10**(45) Date of publication: **10.03.2013 Bull. 7**(85) Commencement of national phase: **28.09.2009**(86) PCT application:  
**IB 2008/050666 (25.02.2008)**(87) PCT publication:  
**WO 2008/104920 (04.09.2008)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

**GEBITsKIJ Ezhi (PL),  
MARTsINEK Andzhej (PL),  
KhLOPITsKIJ Stefan (PL),  
ADAMUS Jan (PL)**

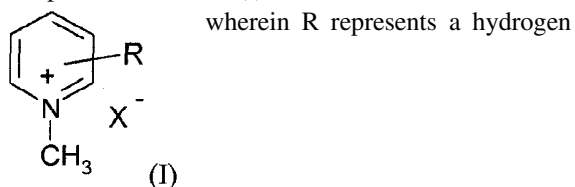
(73) Proprietor(s):

**KhEPENDO SP. Z.O.O. (PL)****(54) USE OF QUARTENARY PYRIDINIUM COMPOUNDS FOR VASOPROTECTION AND/OR HEPATOPROTECTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to using a compound of formula (I):

atom or CH<sub>3</sub>, and X represents a physiologically acceptable counter ion for preparing a

hepatoprotective agent for treating or preventing a liver injury. The invention also refers to a method for treating or preventing the liver injury which involves a therapeutically or preventive effective amount of said compound of formula (I).

EFFECT: declared group of inventions provides hepatoprotective activity ensured by an ability of the compounds of formula (I) to improve an endothelium function to release endogenic prostacyclin.

14 cl, 7 dwg, 3 tbl, 5 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к применению некоторых четвертичных соединений пиридиния для лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией сосудистого эндотелия или поражением печени.

Изобретение основано на уникальной способности конкретных четвертичных соединений пиридиния стимулировать эндогенную продукцию и высвобождение простаглицина PGI<sub>2</sub> в сосудистом эндотелии, который может вызывать терапевтические эффекты при болезнях, связанных с дисфункцией сосудистого эндотелия, окислительным стрессом и недостаточной продукцией эндотелиального PGI<sub>2</sub>, а также в условиях повышенного риска частоты возникновения указанных заболеваний (вазопротективный эффект). Использование таких соединений может обеспечивать лечебный и профилактический терапевтические эффекты, помимо прочего, при диабете, метаболическом синдроме, атеросклерозе, а также при поражениях печени (гепатопротективный эффект).

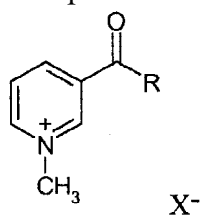
Предшествующий уровень техники

Появляется все больше данных, что дисфункция эндотелия играет ключевую роль в образовании и прогрессировании атеросклеротической бляшки, а также в развитии диабета и осложнений диабета. Дисфункция эндотелия недавно приобрела диагностическую, прогностическую и терапевтическую значимость при тромбозе артерии и диабете (Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T., Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678; Schachinger V., Britten M.B., Zeiher A.M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906; Perticone F., Ceravolo R., Pujia A., Ventura G., Iacopino S., Scozzafava A., Ferraro A., Chello M., Mastroberto P., Verdecchia P., Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 191-196; Suwaidi J.A., Hamasaki S., Higano S.T., Nishimura R.A., Holmes D.R., Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-954), de Jager J., Dekker J.M., Kooy A., Kostense P.J., Nijpels G., Heine R.J., Bouter L.M. et al.: Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26, 1086-1093).

Дисфункцию эндотелия определяют как функциональное состояние эндотелия, которое характеризуется дефицитом факторов вазопротекции и усилением продукции прокоагуляционных и провоспалительных факторов (Chlopicki S., *Kardiologia po Dyplomie*, 2005, Vol. 4, No. 5, 77-88). Клинически дисфункцию эндотелия определяют как нарушение биологической активности NO, которую выявляют как нарушение сосудорасширяющей активности NO. Контроль за биодоступностью NO возможен посредством измерения NO-зависимой сосудосуживающей функции эндотелия *in vivo* (Chlopicki S., *Kardiologia po Dyplomie*, 2005, Vol. 4, No. 5, 75-81). Нарушение активности NO совмещено с оксидативным стрессом (Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T., Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678) и нарушением синтеза PGI<sub>2</sub> (Kyrle P.A., Minar E., Brenner B., Eichler H.G., Heisteringer M., Marosi L., Lechner K. Thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin generation in the microvasculature of patients with atherosclerosis - effect of low-dose aspirin. *Thromb. Haemost.* 1989; 61: 374-377), несмотря на то, что системный уровень PGI<sub>2</sub> может быть повышенным. В действительности, предполагают, что усиленное перекисное окисление жиров может

стимулировать развитие атеросклероза из-за селективного нарушения синтеза простациклина в эндотелиальных клетках и последующей активации тромбоцитов (Gryglewski R.J. Prostacyclin and atherosclerosis. *TIPS* 1980; 1: 164-168; Gryglewski R.J. Prostaglandins, platelets, and atherosclerosis. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1980; 7: 291-338; Gryglewski R.J., Szczeklik A. Prostacyclin and atherosclerosis - experimental and clinical approach. 1983; 213-226). Эта концепция затем была экспериментально обоснована. Сейчас очевидно, что нарушение синтеза PGI<sub>2</sub> в эндотелии может приводить к повышенной стимуляции рецепторов TP в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов посредством TXA<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> или других эйкозаноидов. Такие механизмы приводят к последующему сужению сосудов, активации тромбоцитов, воспалительному ответу эндотелия, а также к апоптозу эндотелия (Chlopicki S., Gryglewski R.J. Endothelial secretory function and atherothrombosis in "The Eicosanoids", chapter 23, 267-276. ed. P. Curtis-Prior, John Wiley and Sons, Ltd, 2004). Это значит, что нарушение синтеза PGI<sub>2</sub> в эндотелии может запустить или усилить воспалительные и тромботические процессы в стенке сосуда, которые сейчас рассматривают как ключевые элементы атеросклероза. Дисфункция эндотелия также играет ключевую роль в развитии диабета (de Jager J., Dekker J.M., Kooy A., Kostense P.J., Nijpels G., Heine R.J., Bouter L.M. et al.: Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26, 1086-1093). Таким образом, результатом способности конкретных четвертичных солей пиридиния стимулировать эндотелиальный синтез PGI<sub>2</sub> может быть их потенциальный противоатеросклеротический и противодиабетический эффекты. Аналогично, при многих других заболеваниях, где роль в патогенезе играет дисфункция эндотелия, фармакологическое усиление синтеза PGI<sub>2</sub> в эндотелии, вызванное указанными соединениями, может вызывать терапевтические эффекты. Некоторые из четвертичных солей пиридиния также могут обладать терапевтическими эффектами при заболеваниях, таких как, например, поражения печени, легочная гипертензия и заживление ран, отвечающих на действие аналогов простациклина.

Применение четвертичных солей пиридиния формулы



где R представляет собой группу NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> или N(H)CH<sub>2</sub>OH и X представляет собой фармацевтически приемлемый противоион для получения вазопротективного соединения для лечения или предотвращения состояний или заболеваний, связанных с дисфункцией сосудистого эндотелия, оксидативным стрессом и/или недостаточной продукцией эндотелиального простациклина PGI<sub>2</sub>, описано в WO2005/067927. В частности, была показана антиатеросклеротическая и тромболитическая активность соединений указанной выше формулы.

В публикациях R. Stadler et al. in. w *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1192-1199 and 1200-1206 сообщали о продуктах распада тригонеллина, образующихся при обжаривании кофе. Согласно имеющимся сведениям основными нелетучими продуктами пиролиза тригонеллина были 1-метилпиридин и соединения диалкилпиридиния. Высказано мнение о потенциальной противораковой активности соединений алкилпиридиния, в

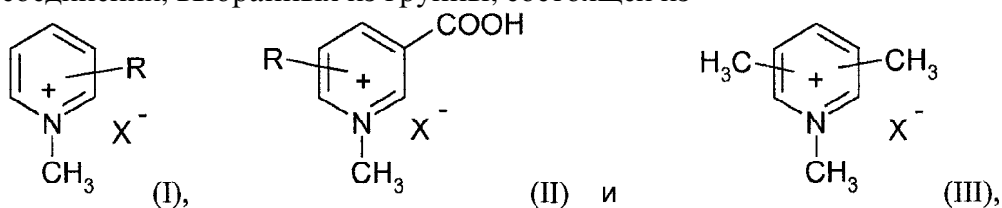
особенности 1-метилпиридина.

Описание изобретения

Задачей настоящего изобретения было предоставление нового терапевтического средства, обладающего вазопротективной и/или гепатопротективной активностью и, таким образом, потенциальной пригодности для лечения и предотвращения, помимо прочего, атеросклероза, тромбоза, диабета, метаболического синдрома и поражений печени различного происхождения.

Неожиданно и удивительно обнаружено, что некоторые соединения, которые образуются в течение процесса термического распада тригонеллина, проявляют вазопротективную, а также гепатопротективную активность из-за их способности улучшать функцию эндотелия стимуляцией высвобождения эндогенного простагличина.

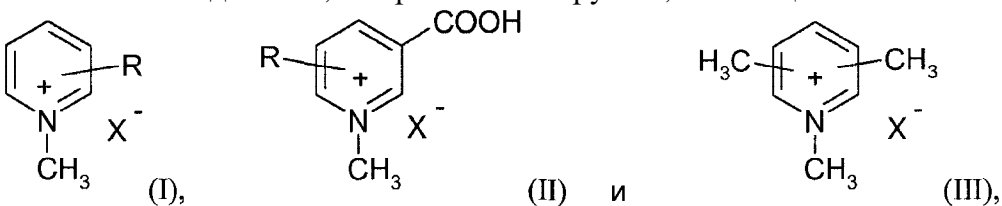
Таким образом, объект по изобретению представляет собой применение соединений, выбранных из группы, состоящей из



где R представляет собой атом водорода, CH<sub>3</sub>, OH, пиридил (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N), 1-метилпиридил (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N-CH<sub>3</sub>) или пиридил, замещенный гидроксигруппой ((OH)C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N), и X представляет собой физиологически приемлемый противоион

для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией сосудистого эндотелия или поражением печени.

Изобретение также относится к способу для лечения или предотвращения заболеваний или состояний, связанных с дисфункцией сосудистого эндотелия или поражением печени, включающему введение пациенту при необходимости такого лечения или предотвращения терапевтически или профилактически эффективного количества соединения, выбранного из группы, состоящей из



где R представляет собой атом водорода, CH<sub>3</sub>, OH, пиридил (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N), 1-метилпиридил (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N-CH<sub>3</sub>) или пиридил, замещенный гидроксигруппой ((OH)C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N), и X представляет собой физиологически приемлемый противоион.

Краткое описание фигур чертежей:

Фиг.1 демонстрирует схему способа для детекции тромболитического действия лекарственных средств *in vivo* у крыс.

Фиг.2 иллюстрирует отсутствие значимого тромболитического ответа после внутривенного введения никотинамида или никотиновой кислоты *in vivo* (30 мг/кг).

Фиг.3 иллюстрирует отсутствие значимого тромболитического ответа после внутривенного введения тригонеллина *in vivo* (30 мг/кг).

Фиг.4 иллюстрирует тромболитический ответ, вызванный внутривенным введением термолизата тригонеллина *in vivo* (30 мг/кг).

Фиг.5 демонстрирует тромболитический ответ *in vivo*, вызванный внутривенным введением 1-метилпиридиния хлорида (30 мг/кг) (верхняя надпись) и 1,4-диметилпиридиния хлорида (30 мг/кг) (нижняя надпись).

Фиг.6 демонстрирует эффект термолизата тригонеллина на возникающую после приема пищи гипергликемию по сравнению с метформинном и необработанным контролем.

Фиг.7 демонстрирует гепатопротективный эффект 1,4-диметилпиридиния хлорида *in vivo*.

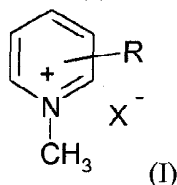
Как определено выше,  $X^-$  может быть любым органическим или неорганическим физиологически приемлемым анионом, т.е. таким анионом, который лишен любых токсических или других неблагоприятных эффектов на организм, в частности, подходящий для перорального введения в терапевтических дозах.

Неограничивающими примерами подходящих физиологически приемлемых неорганических анионов являются хлорид, бромид, иодид и карбонат.

Неограничивающими примерами подходящих физиологически приемлемых органических анионов являются анионы моно-, ди- и трикарбоновых кислот, например ацетат, бензоат, салицилат, гидроксиацетат, лактат, малонат и цитрат и т.д.

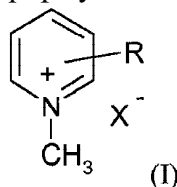
Предпочтительным физиологически приемлемым анионом является хлорид.

В одном из вариантов осуществления соединение имеет формулу



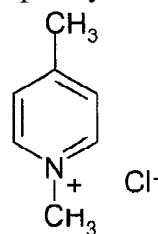
где R представляет собой атом водорода или  $CH_3$  в положении 2 или 4 пиридинового кольца.

Одним из предпочтительных вариантов осуществления является соединение формулы

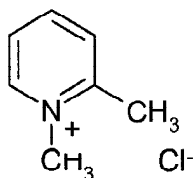


где R представляет собой  $CH_3$  в положении 4 пиридинового кольца.

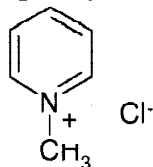
Конкретными соединениями, используемыми в способе по изобретению, являются соли 1,4-диметилпиридина, главным образом хлорид, лактат или цитрат, преимущественно главным образом 1,4-диметилпиридинхлорид формулы



Другими конкретными соединениями, используемыми в способе по изобретению, являются соли 1,2-диметилпиридина, главным образом хлорид, лактат или цитрат, преимущественно главным образом 1,2-диметилпиридинхлорид формулы



Еще конкретными соединениями, используемыми в способе по изобретению, являются соли 1-метилпиридина, главным образом хлорид, лактат или цитрат, преимущественно главным образом 1-метилпиридинхлорид формулы



15 Соединения пиридиния формул (I), (II) и (III) можно получать химическим синтезом, используя общепринятые способы, известные специалистам в области органического синтеза.

Указанные компоненты, например, можно получать, начиная с известных подходящих соединений, не содержащих метильную группу в качестве заместителя при атоме азота пиридинового кольца, т.е. в положении 1 пиридинового кольца.

20 Когда  $X^-$  представляет собой анион галогенида, соединения формулы (I), (II) и (III) можно получать прямым метилированием с помощью метилгалогенида из исходных веществ, не содержащих метильную группу в качестве заместителя при атоме азота, известным способом. Соединения, где  $X^-$  представляет собой анион хлора, можно  
25 получать, например, обработкой исходного соединения, не содержащего метильную группу в качестве заместителя в положении 1, метилхлоридом, как описано, например, в АТ 131118, GB3 48345, US 3614408 и US 4115390.

30 Соединения, где  $X^-$  представляет собой анион, помимо галогенида, можно получать обменом аниона галогенида с другим анионом, например обработкой солями других таких анионов, например солью серебра. Например, лактаты или ацетаты указанных выше соединений можно получать обработкой галогенида, предпочтительно хлорида, солью другого аниона, например солью серебра. Например, лактаты или ацетаты  
35 указанных выше соединений можно получать обработкой галогенида, предпочтительно хлорида, лактатом или ацетатом серебра, соответственно.

40 Указанные выше соединения формул (I), (II) и (III) получают в процессе термического разложения (термолиз) тригонеллина (N-метилникотиновая кислота, 3-карбоксит-1-метилпиридиниевая соль). Отдельные соединения формул (I), (II) и (III) можно, таким образом, также получать разделением продуктов пиролиза тригонеллина (термолизат), полученных, например, пиролизом в бескислородной среде при приблизительно 220°C.

45 Было обнаружено, что обозначенные выше соединения пиридиния обладают уникальными фармакологическими свойствами из-за их способности высвобождать эндогенный простагландин ( $PGI_2$ ) из эндотелия. В результате соединения улучшают тканевую перфузию, проявляют антитромботический, тромболитический, антиапоптотический или антисклеротический виды активности, защищают слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, а также проявляют гепатопротективную  
50 активность при лечении или предотвращении поражений печени.

Преимуществом указанных выше соединений пиридиния является факт, что их вазопротективная активность, вероятнее всего, не сопровождается каким-либо гипотензивным действием. Кроме того, тромболитическая активность не связана с

прямым воздействием на тромбоциты. Указанные выше соединения пиридиния не обладают каким-либо прямым воздействием на активность лейкоцитов.

Без каких-либо намерений, связанных с теоретическими соображениями, авторы настоящего изобретения полагают, что обладающие положительным зарядом соединения, определяемые в настоящем изобретении, через электростатические взаимодействия связываются с присутствующими на поверхности сосудистого эндотелия анионными соединениями, такими как гликозаминогликаны. Следствиями такого связывания могут быть некоторые эффекты эндотелия, эффекты которого могут обладать положительным влиянием с фармакологической точки зрения. Среди таких эффектов может быть высвобождение NO и/или простаглицина, в результате чего можно исправлять дисфункцию эндотелия и можно лечить или предупреждать состояния или заболевания, связанные с такой дисфункцией.

В одном из аспектов применения и способа по изобретению такие состояния или заболевания, связанные с дисфункцией эндотелия, являются заболеваниями, связанными с дисфункцией эндотелия, сопровождающимися холистеринемией, гипертриглицеридемией или низким уровнем холестерина HDL.

В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления указанных выше проявлений заболевание или состояние представляет собой тромбоз или атеросклероз.

В другом аспекте применения и способа по изобретению указанным заболеванием или состоянием может быть острое сердечно-сосудистое состояние, связанное с атеросклерозом, включая внезапную сердечную смерть, острый коронарный синдром (включая нестабильную ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда), состояние, которое требует коронарной ангиопластики (PCI) или аортокоронарного шунтирования (CABG), ишемический инсульт, хирургическое лечение с использованием искусственного кровообращения или состояние, которое требует реваскуляризации периферического кровообращения.

В другом аспекте применения и способа по изобретению указанным состоянием или заболеванием является атеросклероз у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, эпизодами ишемии головного мозга или атеросклерозом конечностей, включая болезнь Бюргера.

В еще одном аспекте применения и способа по изобретению указанное состояние или заболевание выбрано из факторов риска атеросклероза, выбранных из группы, состоящей из гиперхолестеринемии, артериальной гипертензии, курения, гипергомоцистеинемии, резистентности к инсулину, метаболического синдрома, диабета 2-го типа, менопаузы, старения, ожирения, нервно-психического напряжения, инфекций, воспалительных состояний, включая парадонтоз, ревматоидный артрит, васкулопатию аллотрансплантата, и толерантности к нитратам.

В еще одном аспекте применения и способа по изобретению указанным состоянием или заболеванием является дислипидемия, в частности гиперхолестеринемия или гипертриглицеридемия, включая дислипидемию, связанную с низким уровнем HDL в плазме.

В еще одном аспекте применения и способа по изобретению указанное состояние или заболевание, подвергаемое лечению или предупреждению, выбрано из группы, состоящей из хронической сердечной недостаточности, легочной гипертензии, капиллярных осложнений диабета, диабетической нейропатии, нефротического синдрома, хронической почечной недостаточности, респираторного дистресс-синдрома взрослых (ARDS), кистозного фиброза, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), преэклампсии/эклампсии, эректильной дисфункции,



синдрома Штейна-Левенталя, приступов апноэ во сне, системной красной волчанки, серповидноклеточной анемии, неспецифических воспалительных заболеваний кишечника, желудочных или дуоденальных язв, глаукомы, хронических заболеваний печени, первичного амилоидоза и нейродегенеративных заболеваний.

5 Указанное нейродегенеративное заболевание, в частности, может быть выбрано из сосудистой деменции, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

В другом варианте указанное состояние или заболевание, в частности, может быть выбрано из желудочной или дуоденальной язвы, где указанные соединения оказывают гастропротективное действие.

10 В еще одном аспекте применения и способа по изобретению указанное состояние или заболевание представляет собой поражение печени, где указанные соединения оказывают гепатопротективное действие.

15 Указанным поражением печени, в частности, может быть острая печеночная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность или цирроз печени.

Указанным поражением печени также может быть поражение печени, вызванное применением лекарственного средства, такого как стероиды, противогрибковые средства, антибиотики, иммуносупрессанты и т.д. Композицию, содержащую 20 указанные соединения пиридиния, можно использовать профилактически для защиты печени в случае приема лекарственных средств, обладающих гепатотоксичными побочными эффектами. Указанным поражением печени также может быть поражение печени, вызванное приемом алкоголя, вызванное злоупотреблением алкоголя, токсическое поражение печени, вызванное токсичными химическими веществами, 25 такими как, например, растворители, включая тетрахлорид углерода, хлороформ или пестициды, или поражения печени, вызванные вирусным гепатитом.

Дозировка зависит от состояния или заболевания, подлежащего лечению, типа лечения (терапевтический или профилактический), состояния и возраста пациента, 30 подлежащего лечению, и, в конечном итоге, определяется индивидуально врачом-терапевтом. Как правило, количество вводимого соединения пиридиния или смеси соединений пиридиния находится в диапазоне приблизительно от 0,1 до 10000 мг для введения в однократной дозе или в разделенной общей дозе, например от 0,5 мг до 1,125 мг, от 1 мг до 1100 мг, от 1,25 мг до 1075 мг, от 1,5 мг до 1050 мг, от 2,0 мг 35 до 1025 мг, от 2,5 мг до 1000 мг, от 3,0 мг до 975 мг, от 3,5 мг до 950 мг, от 4,0 мг до 925 мг, от 4,5 мг до 900 мг, от 5 мг до 875 мг, от 10 мг до 850 мг, от 20 мг до 825 мг, от 30 мг до 800 мг, от 40 мг до 775 мг, от 50 мг до 750 мг, от 100 мг до 725 мг, от 200 мг до 700 мг, от 300 мг до 675 мг, от 400 мг до 650 мг, от 500 мг или от 525 мг до 625 мг. В 40 другом варианте осуществления количество соединения(ий) пиридиния, включенного во вводимую композицию, составляет от 0,1 мг до 25 мг. В некоторых вариантах осуществления количество соединения(ий) пиридиния, включенного во вводимую композицию, составляет менее чем 100 мг, или менее чем 80 мг, или менее чем 60 мг, или менее чем 50 мг, или менее чем 30 мг, или менее чем 20 мг, или менее чем 10 мг, или 45 менее чем 5 мг, или менее чем 2 мг, или менее чем 0,5 мг.

Соли пиридиния по изобретению, как определено выше, можно вводить в качестве фармацевтических композиций или пищевых добавок в форме для перорального введения или проглатывания. Такие формы могут включать общепринятые 50 фармацевтические формы. Формы для перорального введения, такие как таблетки, твердые и мягкие капсулы, порошки, гранулы, растворы, суспензии и т.д. Они включают эксципиенты (неактивные ингредиенты), обычно используемый в данной области состав фармацевтических лекарственных форм препарата, такие как

носители, наполнители, добавки для таблеток, вкусовые добавки и т.д. Каждый из таких эксципиентов должен быть "приемлемым", т.е. должен быть совместим с другими компонентами препарата, в частности с активным ингредиентом, и не должен быть токсичным для пациента. Неограничивающими примерами таких веществ, которые можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей и наполнителей, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и производные целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, микрокристаллическая целлюлоза; трагакант; поливинилпирролидон; фосфат кальция. Препарат для перорального введения также может включать лубриканты и соединения, облегчающие циркуляцию, такие как стеараты, например стеарат магния, тальк или диоксид кремния; расщепляющие соединения, такие как, например, крахмалгликолят натрия. Таблетки могут быть покрыты общепринятыми оболочками или оболочками для замедленного высвобождения.

Жидкие препараты для перорального введения включают растворы, сиропы или суспензии. Подходящим растворителем является вода. Они также могут включать общепринятые консерванты, обычно используемые для подавления роста микроорганизмов, такие как, например, парабены, аскорбиновую кислоту, тимеросал, сорбиновую кислоту, метил или пропил пара-гидроксibenзоат и т.д.

Соединения также можно вводить парентерально в форме внутривенных или подкожных инъекций. Подходящим растворителем является апиrogenная вода, изотонический раствор, фосфатные буферы, раствор Рингера, маслянистые носители и другие нетоксические вещества, используемые для препарата фармацевтических лекарственных форм. Они могут включать изотонирующие соединения, такие как хлорид натрия, сахара или многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и стабилизаторы или консерванты.

Соединения также можно вводить с помощью ингаляции, особенно в случае лечения хронических обструктивных заболеваний легких. В частности, соединения можно вводить ингаляционно в форме тонкоизмельченного порошка или аэрозоля для распыления. Их также можно вводить интраназально в форме аэрозоля для распыления. Также предполагают ректальное введение соединений в способе по изобретению в форме кремов, мазей или суппозиториев. В любом случае препарат включает реципиенты, носители и растворители в подходящей для применения лекарственной форме.

Указанные выше лекарственные формы не лимитируют каким бы то ни было образом способ введения соединений пиридиния или содержащих их композиций.

Описания стандартных и общепринятых препаратов, способов их получения и эксципиенты можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 Ed., 2005.

Для применения, как определено в изобретении, соединения пиридиния можно поставлять в качестве пищевых добавок. Соединения пиридиния, в соответствии с введением по изобретению, можно добавлять в питательные продукты любой формы, обычно в количестве, по меньшей мере, 5% по массе питательного продукта без ограничения применяемого состава.

В качестве неограничивающих примеров, питательные продукты могут быть в форме жидкости, эмульсии или пасты, такой как напиток, включая безалкогольные напитки и алкогольные напитки, молочные напитки, молочные продукты, такие как

йогурты. Другим примером могут быть твердые продукты, такие как, например, леденцы, жевательные резинки, железные конфеты, шоколад и порошкообразные продукты, например напитки в порошке для разведения в воде перед употреблением.

5 Для использования по изобретению соединения пиридиния также можно добавлять в витаминные добавки в твердой форме, такие как таблетки, капсулы, порошки для разведения или напитков, содержащие, помимо соединения формул (I), (II) или (III), стандартные компоненты витаминных добавок.

10 Примеры ниже поясняют применение и фармакологическую активность соединений пиридиния по изобретению.

#### Пример 1

##### Получение термолизата тригонеллина

15 Термолизат тригонеллина получали термическим разложением (пиролиз) тригонеллина при 220°C в течение 30 минут. Тригонеллин (в форме тонкого слоя кристаллов) подвергали пиролизу в тонкостенной стеклянной ампуле, заполненной аргоном.

20 Полученную смесь продуктов пиролиза растворяли в воде, раствор фильтровали и экстрагировали с помощью хлороформа. Воду отгоняли, используя ротационный испаритель, и остаток высушивали над пентоксидом фосфора.

Предварительный анализ продуктов пиролиза (термолизат) с помощью способа масс-спектрометрии ToF-SIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) представлен ниже.

#### Таблица 1

25 SIMS анализ - композиция термолизата тригонеллина; идентифицированные соединения





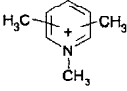
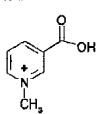
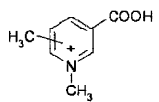

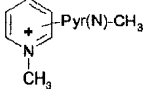
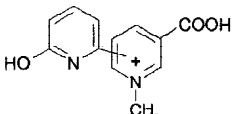
30

35

40

45

50

Продукт	Структура	m/e	Пик интенсивности
5 $C_5H_5N$		79	9265
$C_5H_5NH$		80	3305
10 $C_5H_5NCH_3$		94	480657
$CH_3(C_5H_4)NCH_3$		108	14580
15 $CH_3CH_3(C_5H_3)NCH_3$		122	3472
20 $COOH(C_5H_4)NCH_3$		138	87964
25 $CH_3COOH(C_5H_3)NCH_3$		152	25725
$CH_3N_{\text{pyr-pyr}}N$		171	31922
30 $CH_3N_{\text{pyr-pyr}}NCH_3$		186	2206
35 $OH_{\text{pyr-COOH}}(C_5H_3)NCH_3$		231	30048

Вероятнее всего, основным продуктом пиролиза является катион 1-метилпиридиния, который преобладает в спектре. Остальными продуктами, присутствующими в значимых количествах, являются катионы 1,2- и 1,4-диметилпиридиния и катионы: метилтригонеллин, (2'-гидроксипиридин)тригонеллин, N-метил(пиридин)пиридиний и N-метил(N'-метилпиридин)пиридиний.

#### Пример 2

Связывание катионов пиридиния с иммобилизованным гепарином в качестве индикатора тромболитического ответа

Проведенные авторами изобретения исследования показали сильную корреляцию связывания представляющих интерес соединений с гепарином, который может быть связан с присутствием положительно заряженных катионов пиридиния в их структуре, и тромболитическую активность соединений. Для незаряженных производных пиридиния как, например, другие метаболиты никотинамида, не наблюдали ни связывание, ни тромболитическую активность.

Присутствие гепарина в солевом растворе пиридиния изменяет спектр поглощения

соли через неспецифические электростатические взаимодействия катионов пиридиния с отрицательно заряженными молекулами гепарина. Использование водонерастворимого иммобилизованного на сефарозе гепарина, который связывает некоторые части катионов пиридиния, является причиной снижения концентрации соли в растворе. Следует подчеркнуть, что связывающее сефарозу соединение не связывается с катионами пиридиния.

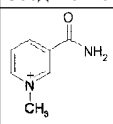
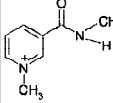
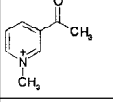
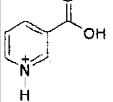
При большом избытке иммобилизованного гепарина по отношению к концентрации соли пиридиния степень связывания зависит только от концентрации гепарина. Это позволяет, используя описанный ниже экспериментальный принцип, оценить степень связывания различных соединений пиридиния с гепарином, при условии, что используют аналогичную концентрацию солей пиридиния и постоянную концентрацию иммобилизованного на сефарозе гепарина.

#### Принцип измерения связывания катионов пиридиния с иммобилизованным гепарином

Для оценки степени связывания соединений пиридиния с гепарином использовали спектрофотометрический способ, основанный на измерении поглощения водных растворов тестируемых соединений в количестве 20 ÷ 100 мкМ перед и после контакта с гепарином.

Водные растворы тестируемых соединений добавляли в суспензию иммобилизованного гепарина (Heparin Sepharose CL-6B, Amersham Biosciences AB, Sweden) (25 мг/мл) в ультрачистой воде из системы Millipore-Milli-Q и инкубировали в течение 5 минут. Суспензии иммобилизованного гепарина с тестируемыми соединениями затем помещали в микропробирки Eppendorf и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 4 минут, используя микроцентрифугу FORCE 1418 от Labnet Int. (Edison, NJ, USA). Спектр поглощения полученных чистых супернатантов в ультрафиолетовой и видимой области спектра измеряли с помощью спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 40. Все измерения проводили при комнатной температуре. Степень связывания оценивали на основании сравнения объединенной области под кривой поглощения для подвергнутых инкубации растворов и растворов, не контактировавших с гепарином.

Результаты для некоторых соединений пиридиния и метаболитов никотинамида представлены в таблицах 2 и 3 ниже.

Таблица 2 Степень связывания 3-замещенных солей пиридиния и некоторых метаболитов никотинамида с известной антитромботической активностью с иммобилизованным на сефарозе гепарином			
Соединение		Степень связывания	Тромболитический ответ
	1-метилникотинамид MNA <sup>+</sup>	>45%	Да
	1-метил-N'-(гидроксиметил)никотинамид MNAF <sup>+</sup>	>35%	Да
	1-метил-3-ацетилпиридин MAP <sup>+</sup>	>25%	Да
	Никотиновая кислота NC	>40%	Нет

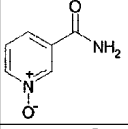
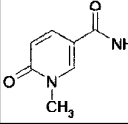
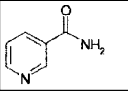
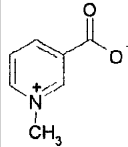
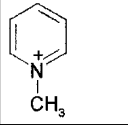
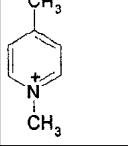
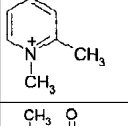
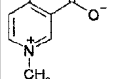
		Никотинамид N-оксид N-OX	>10%	-
5		1-метил-2-пиридон-5-карбоксамид 2-PYR	>5%	Нет
10		Никотинамид NA	≈0%	Нет

Таблица 3 Степень связывания тригонеллина и продуктов его термического разложения с иммобилизованным на сефарозе гепарином				
Катион пиридиния		Степень связывания	Тромболитический ответ	
15		Тригонеллин Tryg	≈0%	Нет
20		1-метилпиридин MP <sup>+</sup>	>25%	Да
25		1,4-диметилпиридин 14-DMP <sup>+</sup>	>20%	Да
		1,2-диметилпиридин 12-DMP <sup>+</sup>	>15%	-
30		4-метилтригонеллин 4MeTryg	>5%	-

35 Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что описанные выше четвертичные соли пиридиния обладают тенденцией связываться с гепарином, что может означать их способность взаимодействовать с поверхностью сосудистого эндотелия и объяснять их терапевтический эффект. Терапевтический эффект, особенно тромболитический эффект соединений, представленных в таблице 2, подробно описан  
40 (см. патент WO 2005/067927 A2) и противоположен свойствам других незаряженных метаболитов никотинамида, которые не проявляют какой-либо значимой антитромботической активности.

45 Можно заключить, что весьма вероятно ожидать сильный тромболитический ответ для всех катионных продуктов, присутствующих в термолизате тригонеллина. В случае двух соединений, 1-метилпиридина и 1,4-диметилпиридина, их связывание с гепарином сопровождается антитромботическим эффектом *in vivo*. Хотя простую корреляцию между этими эффектами не ожидают, уже полученные результаты указывают на отсутствие тромболитического ответа для соединений, которые не  
50 связываются с гепарином (таблица 2). Существенным фактором в неспецифических электростатических взаимодействиях полианиона с катионом является присутствие положительного заряда на атоме пиридиниевого кольца. Соединения с пространственно крупными заместителями на кольцевом атоме азота, например,

группами пропила или бензила, связываются с гепарином слабее по сравнению с их N-метилзамещенными аналогами или не связываются вообще. В случае цвиттерионных соединений (например, тригонеллин), отрицательный заряд молекулы может

5

нейтрализовать эффект связывания положительно заряженного пиридинового кольца.

Пример 3

Определение тромболитических эффектов термолизата тригонеллина

10

Тромболитическую активность анализировали способом, оригинально разработанным Gryglewski et al. (Gryglewski R.J., Korbut R., Oعتkiewicz A., Stachura J. *In vivo method for quantitation for anti-platelet potency of drugs. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1978; 302: 25-30; Gryglewski R.J. 1978, Gryglewski et al., 2001). Схема способа показана на фиг.1.

15

Крысам линии Вистар (масса тела 300-350 г) проводили анестезию (тиопентал 95 мг/кг интраперитонеально) и гепаринизацию (800 Ед/кг внутривенно). Канюли помещали в артерии и из русла левой сонной артерии соединяли с датчиком давления, а из правой сонной артерии через нагретую (37°C) трубку - с перистальтическим насосом. Кровь из сонной артерии выкачивали в систему искусственного кровообращения, где ее наливали (1,5 мл/мин) на коллагеновую полосу длиной 3 см, отсеченную от ахиллова сухожилия, прикрепленную к ауксотоническому рычагу пружинных весов изоосмотического преобразователя Harvard 386, и непрерывно регистрировали массу коллагеновой полоски. После переливания кровь возвращали в систему кровообращения животного. В течение наливания на поверхности коллагеновой полоски формировался тромб, состоящий из агрегатов тромбоцитов, застрявших в фибриновой сети (визуализация с помощью микроскопа способом Вейгерта). Непрерывно регистрировали давление и массу тромба.

20

25

30

После 20-30 мин наливания масса насыщенного тромбоцитами тромба достигала плато на уровне приблизительно 70-100 мг, и данный уровень находился в равновесии в течение 3-5 часов до тех пор, пока длилось наливание крови, пока активное соединение вводили внутривенно. Затем термолизат тригонеллина, 1-метилпиридин или 1,4-диметилпиридин вводили внутривенно в бедренную вену (30 мг·кг<sup>-1</sup>). Вызванный лекарственным средством тромболитический эффект наблюдали как снижение массы тромба.

35

40

45

50

Внутривенная инъекция термолизата тригонеллина, полученного, как описано в примере 1, вызывает тромболитический ответ у крыс линии Вистар с искусственным кровообращением. После однократной инъекции термолизата тригонеллина (30 мг/кг) наблюдали тромболитический эффект, достигающий плато 35±3,5% после 30 мин и длящийся на том уровне приблизительно в течение 2-3 часов. 1-метилпиридин (30 мг/кг), являющийся основным компонентом термолизата тригонеллина, также вызывал умеренный тромболитический ответ. 1,4-диметилпиридин вызывал тромболитический ответ, который по величине и характеру похож на тромболитический ответ, вызванный термолизатом тригонеллина. В отличие от термолизата тригонеллина, 1-метилпиридина и 1,4-диметилпиридина, сам по себе тригонеллин (30 мг/кг) не вызывал значимого тромболитического ответа. Тромболитический ответ на никотинамид или никотиновую кислоту был кратковременным (менее чем 15-20 мин), и их максимальное значение составляло лишь 9±0,6% и 5±0,9% соответственно. В случае тригонеллина тромболитического ответа не наблюдали. Результаты этих экспериментов показаны на фиг.2-5.

Пример 4

Противодиабетические эффекты термолизата тригонеллина на модели

метаболического синдрома крысы

Крысы с избыточным весом Zucker (fa/fa) представляют собой широко используемую модель генетически обусловленного ожирения, метаболического синдрома и дислипидемии, которая имитирует метаболический синдром (также называют синдром резистентности к инсулину), ведущую к развитию проявления диабета типа-2. Диагностическим симптомом резистентности к инсулину является высокая гипергликемия, возникающая после приема пищи, которая может быть вызвана инъекцией глюкозы экспериментально. У людей высокая гипергликемия, возникающая после приема пищи, предшествует развитию диабета 2 типа и представляет собой прогностический фактор для сердечно-сосудистых осложнений диабета. Высокую гипергликемию, возникающую после приема пищи, можно также наблюдать у крыс с избыточным весом Zucker (fa/fa).

Крыс с избыточным весом Zucker (fa/fa) (CrI:ZUC(Orl) - Lepra) в возрасте 10 недель обрабатывали термолизатом тригонеллина (100 мг/кг) (получено, как описано в примере 1) в течение 7 дней с метформин (500 мг/кг) или оставляли необработанными (n=3-4 крысы в каждой экспериментальной группе). Через 7 дней вводили глюкозу в дозе 2 г/кг (интраперитонеально) и анализировали гипергликемию, возникающую после приема пищи, в следующие периоды: 0, 15, 30, 60 и 90 минут после инъекции глюкозы. Как показано на фиг.6, обработка термолизатом тригонеллина (100 мг/кг) снижала гипергликемию, возникающую после приема пищи, вызванную инъекцией глюкозы до соответствующей степени, как и в случае метформина (500 мг/кг). Таким образом, термолизат тригонеллина обладает противодиабетическими свойствами.

Обработка термолизатом тригонеллина не влияла на уровни триглицеридов или свободных жирных кислот в плазме, которые составляли  $3,5 \pm 0,2$ ,  $1,3 \pm 0,09$  ммоль/л и  $4,1 \pm 0,3$ ,  $1,4 \pm 0,07$  ммоль/л для крыс в контроле и крыс, обработанных термолизатом тригонеллина соответственно.

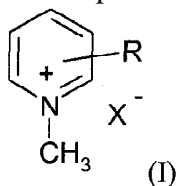
## Пример 5

Гепатопротективные эффекты 1,4-диметилпиридиния хлорида на модели острого повреждения печени мыши

Мыши Balb/c в возрасте 2 месяцев обрабатывали 1,4-диметилпиридиния хлоридом (100 мг/кг, через рот) в течение 7 дней или оставляли необработанными и затем мышам вводили конканавалин А (ConA), вызывающий Т-клеточно-опосредованный гепатит. ConA вводили внутривенно в дозе 20 мг/кг и спустя 8 часов по уровню трансаминазы (AST) в плазме оценивали поражение печени. Как показано на фиг.7, обработка 1,4-диметилпиридиния хлоридом (100 мг/кг) предотвращает повышение уровня AST после инъекции Con A. Таким образом, 1,4-диметилпиридиний обладает гепатопротективной активностью.

## Формула изобретения

1. Применение соединения формулы (I), выбранного из группы, состоящей из



где R представляет собой атом водорода или  $\text{CH}_3$ , и X представляет собой физиологически приемлемый противоион,



для получения гепатопротективного средства для лечения или предотвращения поражения печени.

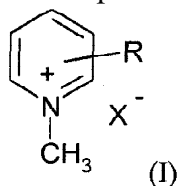
2. Применение по п.1, где указанное поражение печени представляет собой острую печеночную недостаточность, хроническую печеночную недостаточность или цирроз печени.

3. Применение по п.1, где указанное поражение печени представляет собой поражение печени, вызванное лекарственным средством, поражение печени, вызванное приемом алкоголя, токсическое поражение печени или поражение печени, вызванное вирусным гепатитом.

4. Применение по п.1, где указанное лекарственное средство вводят перорально.

5. Применение по п.1, где указанное лекарственное средство вводят парентерально.

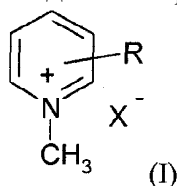
6. Применение по п.1 соединения формулы (I)



где R представляет собой атом водорода или  $\text{CH}_3$  в положении 2 или 4 пиридинового кольца.

7. Применение по п.6, где R представляет собой  $\text{CH}_3$  в положении 4 пиридинового кольца.

8. Способ для лечения или предотвращения поражения печени; включающий введение пациенту при необходимости такого лечения или предотвращения терапевтически или профилактически эффективного количества соединения формулы (I)



где R представляет собой атом водорода или  $\text{CH}_3$ , и X представляет собой физиологически приемлемый противоион.

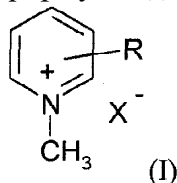
9. Способ по п.8, где указанное поражение печени представляет собой острую печеночную недостаточность, хроническую печеночную недостаточность или цирроз печени.

10. Способ по п.8, где указанное поражение печени представляет собой поражение печени, вызванное лекарственным средством, поражение печени, вызванное приемом алкоголя, токсическое поражение печени или поражение печени, вызванное вирусным гепатитом.

11. Способ по п.8, где указанное введение осуществляют перорально.

12. Способ по п.8, где указанное введение осуществляют парентерально.

13. Способ по п.8, где указанное соединение представляет собой соединение формулы (I)



где R представляет собой атом водорода или  $\text{CH}_3$  в положении 2 или 4

пиридинового кольца.

14. Способ по п.13, где R представляет собой  $\text{CH}_3$  в положении 4 пиридинового кольца.

5

10

15

20

25

30

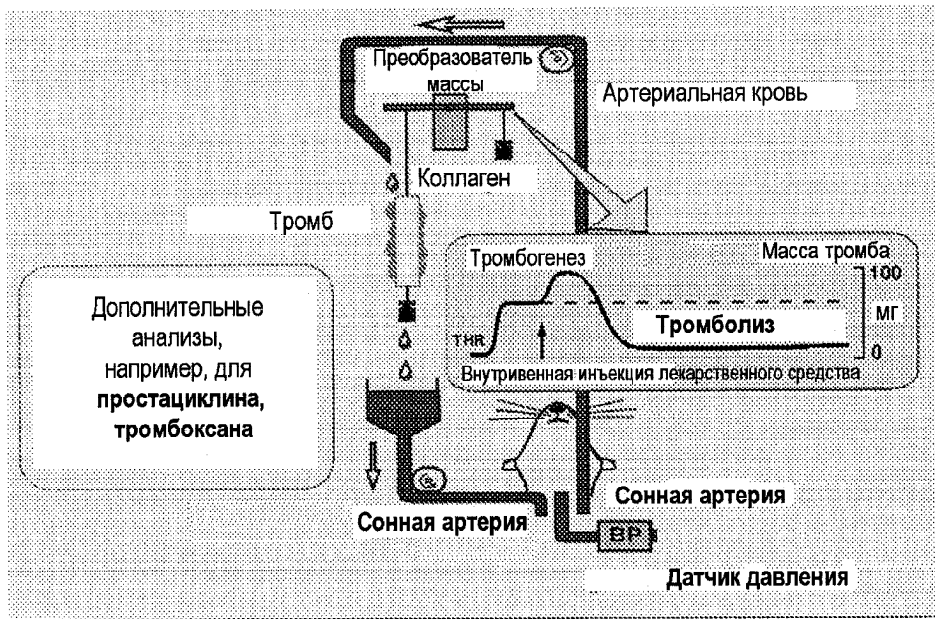
35

40

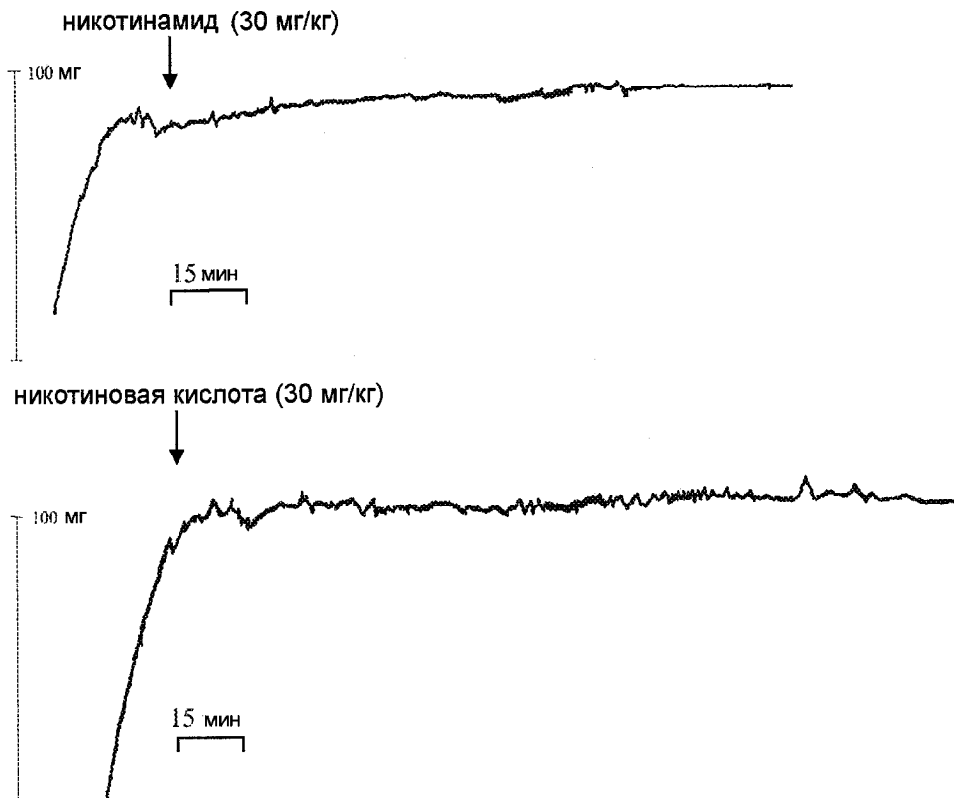
45

50

Схема способа для определения тромболитической активности лекарственных средств *in vivo* на крысах (по Gryglewski et al.)

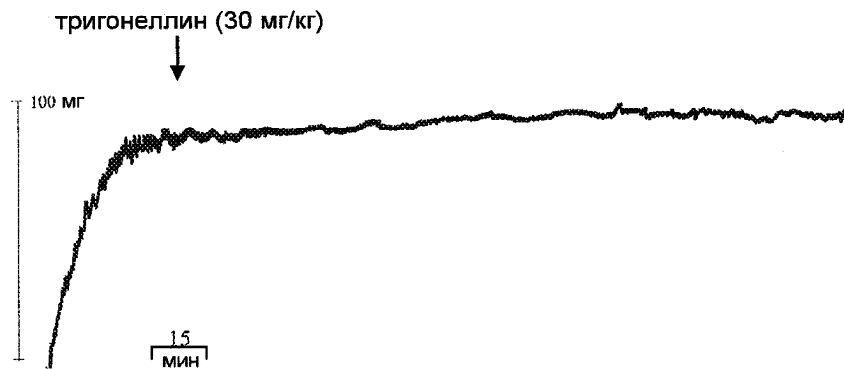


**ФИГ. 1**



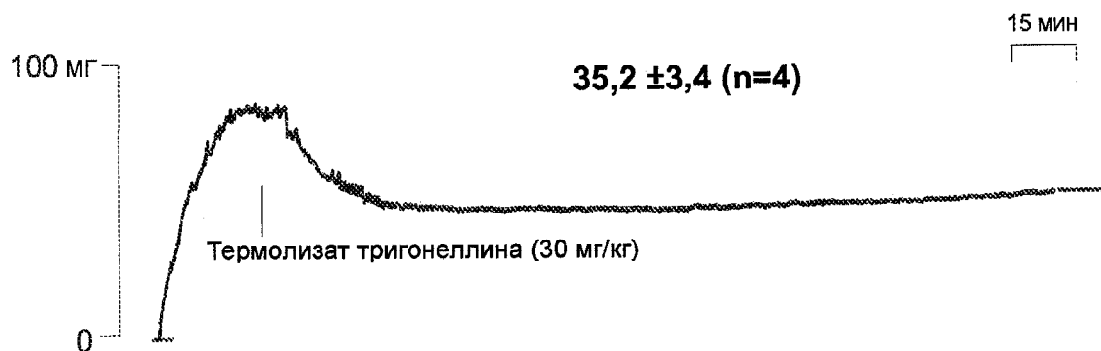
Эффект внутривенного введения никотинамида или никотиновой кислоты *in vivo* (30 мг/кг)

**ФИГ. 2**



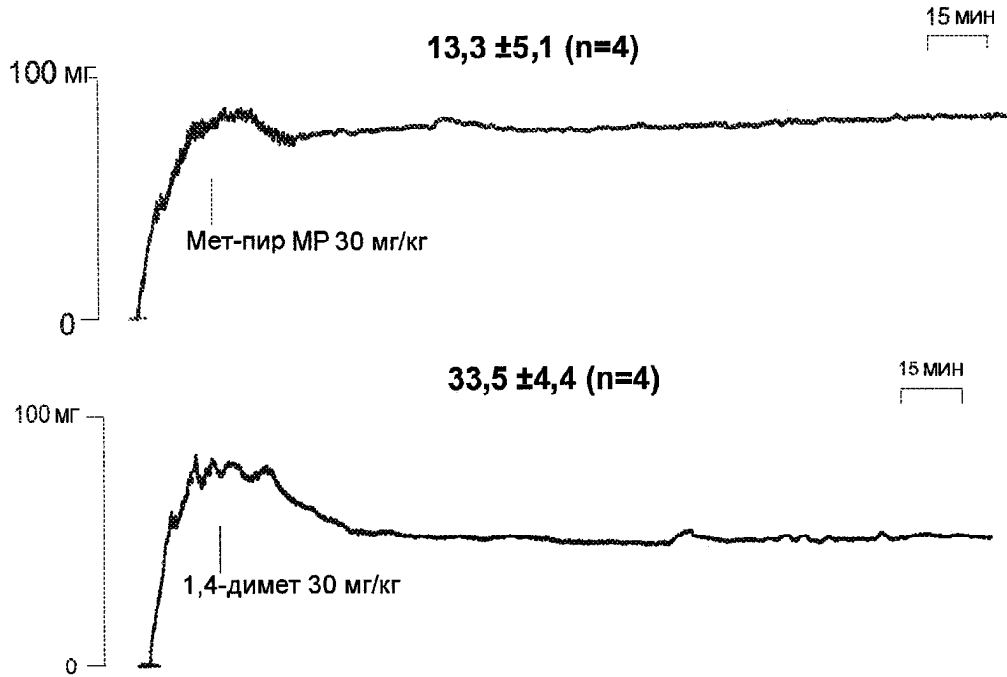
Эффект внутривенного введения тригонеллина in vivo (30 мг/кг)

**ФИГ. 3**



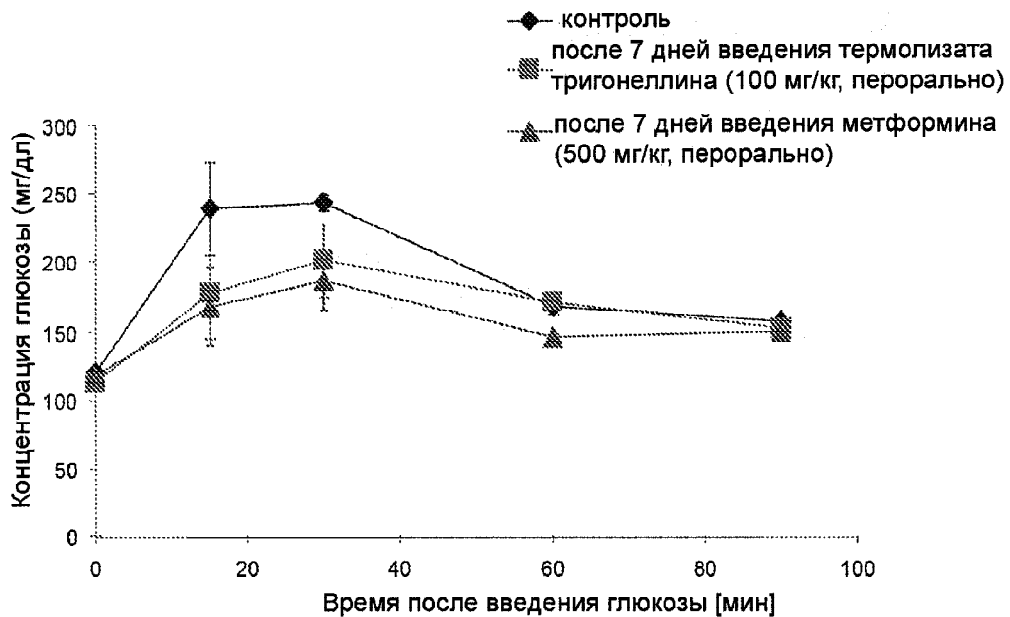
Тромболитический ответ, вызванный внутривенным введением термолизата тригонеллина in vivo (30 мг/кг)

**ФИГ. 4**



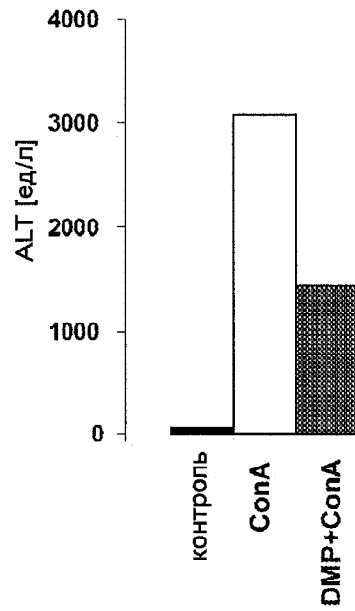
Тромболитический ответ, вызванный внутривенным введением 1-метилпиридиний хлорида (30 мг/кг) (верхняя надпись) и 1,4-диметилпиридиний хлорида (30 мг/кг) (нижняя надпись) *in vivo*

**ФИГ. 5**



Влияние термолизата тригонеллина на гипергликемию, возникающую после приема пищи, по сравнению с метформинном и необработанным контролем

**ФИГ. 6**



Гепатопротективный эффект  
1,4-диметилпиридиний хлорида in vivo

**ФИГ. 7**