

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201892298 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.04.30

(22) Дата подачи заявки
2017.03.13

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ХОЛЕСТАТИЧЕСКИХ И ФИБРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 16305425.7

(32) 2016.04.11

(33) EP

(86) PCT/EP2017/055878

(87) WO 2017/178172 2017.10.19

(71) Заявитель:
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:
Дартей Рафаэль, Вальчак Роберт,
Беланже Кароль, Негро Эмили,
Доберси Пьер, Делатай Филипп (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединению [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанату (нитазоксанид) или 2-гидрокси-N-(5-нитро-2-тиазолил)бензамиду (тизоксанид) для лечения холестатических и фибротических заболеваний.

A1

201892298

201892298

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-552716ЕА/019

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ХОЛЕСТАТИЧЕСКИХ И ФИБРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, к лечению холестатических или фибротических заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аномальное и усиленное накопление внеклеточного матрикса является признаком фибротических заболеваний, в том числе фиброза печени, легких, почек и сердца. Спектр пораженных органов, прогрессирующая природа фибротического процесса, большое количество страдающих индивидуумов и отсутствие эффективного лечения являются огромной проблемой при лечении фибротических заболеваний.

В попытках предложить новые терапевтические стратегии для лечения фибротических заболеваний, авторы изобретения обнаружили, что соединение 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанوات (нитазоксанид или NTZ), синтетическое антипротозойное средство, также демонстрирует мощные противофиброзные свойства. Более того, оценка NTZ в модели повреждения печени продемонстрировала его способность снижать концентрацию циркулирующих желчных кислот, таким образом, отражая его потенциал к лечению как холестатических (таких как PBC и PSC), так и фибротических заболеваний.

Было показано, что NTZ, впервые описанный в 1975 году (Rossignol and Cavier, 1975), является высокоэффективным против анаэробных простейших, гельминтов и широкого спектра микробов, включая как анаэробные, так и аэробные бактерии (Rossignol and Maisonneuve, 1984; Dubreuil, Houcke et al., 1996; Megraud, Occhialini et al., 1998; Fox and Saravolatz, 2005; Pankuch and Appelbaum, 2006; Finegold, Molitoris et al., 2009). Сначала его исследовали у человека для лечения, направленного против кишечных цестод (Rossignol and Maisonneuve, 1984), и в настоящее время он лицензирован в США (Alinia®, Romark laboratories) для

лечения диареи, вызванной паразитами-простейшими *Cryptosporidium parvum* и *Giardia intestinalis*. NTZ также широко продается в Латинской Америке и Индии, где он показан для лечения широкого спектра кишечных паразитарных инфекций (Hemphill, Mueller et al., 2006). Полагают, что возможным механизмом действия, посредством которого NTZ проявляет его антипаразитарную активность, является ингибирование зависимых от фермента пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (PFOR) реакций с переносом электронов, которые необходимы для анаэробного метаболизма (Hoffman, Sisson et al., 2007). NTZ также проявляет активность против *Mycobacterium tuberculosis*, которые не обладают гомологом PFOR, что, таким образом, указывает на альтернативный механизм действия. Действительно, было показано, что NTZ также выступает в качестве разобщителя, нарушающего мембранный потенциал и гомеостаз pH внутри организма (de Carvalho, Darby et al., 2011).

Фармакологические эффекты NTZ не ограничиваются его антипаразитарной активностью и в последние годы в нескольких исследованиях было показано, что NTZ также может проявлять противовирусную активность (Di Santo and Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). NTZ препятствует репликации вирусов различными путями, включая блокаду созревания белков гемагглютиниона (вирус гриппа) или VP7 (ротавирус), или активацию белка PKR, вовлеченного во врожденный иммунный ответ (для обзора, см. (Rossignol, 2014)). Было показано, что NTZ обладает выраженными противораковыми свойствами, препятствуя ключевым метаболическим и способствующим гибели сигнальным путям (Di Santo and Ehrisman, 2014).

В рамках настоящего изобретения с использованием фенотипического скринингового анализа для идентификации потенциальных противofiброзных средств было обнаружено, что NTZ или его активный метаболит тизоксанид (или TZ) препятствуют активации звездчатых клеток печени (HSC), которые играют ключевую роль в развитии фиброза печени. Этот эффект был абсолютно неожиданным ввиду свойств, ранее описываемых для этих молекул. Более того, было показано, что NTZ и TZ препятствуют активации стимулированных фибробластов в других органах, таких

как сердце, легкое и кишечник. Противофиброзные свойства NTZ были далее подтверждены в доклинической модели заболевания печени (NASH, индуцированный диетой с CDAAs) путем демонстрации значительно сниженных уровней коллагена и фиброза в печени. В дополнение к противофиброзной активности, также было показано, что NTZ снижает концентрацию циркулирующих желчных кислот в модели индуцируемого CCl₄ повреждения печени. Таким образом NTZ и TZ оказались соединениями, представляющими интерес для лечения холестатических заболеваний и различных типов фибротических заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к соединению [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанойату (нитазоксанид) или его активным метаболитам 2-гидрокси-N-(5-нитро-2-тиазолил)бензамиду (тизоксанид) или тизоксанида глюкурониду (TZG), или к их фармацевтически приемлемым солям, для применения в способе лечения холестатического или фибротического заболевания.

В конкретном варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечного тракта, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, суставов, глаз и желудка. В следующем конкретном варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка. В следующем конкретном варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечника, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягких тканей, костного

мозга, кишечника и суставов. В другом варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза легких, идиопатического фиброза легких, фиброза кожи, фиброза глаз (такого как фиброз капсулы), эндомикардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, забрюшинного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза (осложнение пневмокониоза шахтеров), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза легких после хронического воспалительного заболевания дыхательных путей (COPD, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез), алкогольного или индуцируемого лекарственными средствами фиброза печени, цирроза печени, индуцируемого инфекцией фиброза печени, индуцируемого радиацией или химиотерапией фиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Крона, язвенного колита, келоида, перенесенного инфаркта миокарда, склеродермии/системной склеродермии, артрофиброза, некоторых форм адгезивного капсулита, хронических фиброзирующих холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), атрезия желчных протоков, семейный внутрипеченочный холестаз 3 типа (PFIC3), периимплантационного фиброза и асбестоза.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутрипеченочного холестаза при беременности, прогрессирующего внутрипеченочного холестаза, атрезии желчных путей, холелитиаза, инфекционного холангита, холангита, ассоциированного с гистиоцитозом клеток лангерганса, синдрома Алажилля, внесиндромной недостаточности протоков, индуцируемого лекарственными средствами холестаза и ассоциированного с полным парентеральным питанием холестаза. В конкретном варианте осуществления холестатическое заболевание представляет собой PBC.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, выбранное из NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или

TZ(G), для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения, где указанное соединение(я) является единственным активным ингредиентом(ами) в композиции.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к соединению или фармацевтической композиции, как определено выше, для применения для лечения фибротического нарушения в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством с известной противофиброзной активностью, выбранным из пирфенидона или ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого противофиброзного соединения, связанного с препятствованием активируемым TGF β и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III), или компоненты SMAD-зависимого канонического каскада, включающего регуляторные или ингибиторные белки SMAD, или представители независимых от SMAD или неканонических каскадов, включая различные ветви передачи сигнала MAPK, TAK1, каскады передачи сигнала Rho-подобной GTP-азой, каскады фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, TGF β -индуцируемый процесс EMT или канонические и неканонические каскады передачи сигнала Hedgehog, включающие лиганды Hh или гены-мишени, или любые представители каскадов WNT или Notch, которые подвержены влиянию передачи сигнала TGF β .

Кроме того, изобретение относится к соединению или фармацевтической композиции, как определено выше, для применения в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством, выбранным из ингибиторов JAK/STAT, других противовоспалительных средств и/или иммунодепрессантов.

Согласно конкретному варианту осуществления терапевтически активное средство выбрано из глюкокортикоидов, NSAID, циклофосфида, нитрозомочевины, аналогов фолиевой кислоты,

аналогов пуринов, аналогов пиримидинов, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов рецепторов сфингозин-1-фосфата, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, Т-клеточный рецептор, интегрины.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

- NTZ или фармацевтически приемлемую соль NTZ; и
- TZ (G) или фармацевтически приемлемую соль TZ (G).

Также изобретение относится к наборам, содержащим:

- NTZ или фармацевтически приемлемую соль NTZ; и
- TZ (G) или фармацевтически приемлемую соль TZ (G).

Согласно конкретному варианту осуществления в каждом аспекте и варианте осуществления, описанном в настоящем описании, используют NTZ или TZ, или фармацевтически приемлемую соль NTZ или TZ.

ОПИСАНИЕ ФИГУР И ТАБЛИЦ

Сокращенные обозначения, использованные на фигурах, в таблицах и в тексте:

α -SMA: альфа-гладкомышечный актин

BMP: морфогенетический белок костей

кДНК: комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

COL1A1: коллаген 1 типа, альфа 1

CDAА: рацион с дефицитом холина, определяемым L-аминокислотами

CDAАс: рацион с дефицитом холина, определяемым L-аминокислотами, дополненный холестерином

CHOL: холестерин

CSAA: рацион, определяемый L-аминокислотами, дополненный холином

CYPA: циклофилин А

DDC: 3, 5-диэтоксикарбонил-1, 4-дигидроколлидин

DMSO: Диметилсульфоксид

ELISA: Твердофазный иммуноферментный анализ
EMT: Эпителиально-мезенхимальный переход
DTT: Дитиотреитол
FBS: Эмбриональная телячья сыворотка
FDA: Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств
GDF: Факторы роста и дифференцировки
Hh: Hedgehog
hHSC: Звездчатые клетки печени человека
HSC: Звездчатые клетки печени
IC₅₀: Полумаксимальная ингибиторная концентрация
InMyoFib: Кишечные миофибробласты
MMP2: матриксная металлопептидаза 2
MMP9: матриксная металлопептидаза 9
мкл: микролитры
NHLF: нормальные фибробласты легкого человека
NTZ: Нитазоксанид
PBC: первичный билиарный холангит
PBS: Фосфатно-солевой буфер
PSC: Первичный склерозирующий холангит
кПЦР: количественная полимеразная цепная реакция
пМоль: пикомоль
rhFGF: рекомбинантный основной фибробластный фактор роста человека
РНК: Рибонуклеиновая кислота
RT: Обратная транскриптаза
SmBM: Базальная среда гладкомышечных клеток
SteCGS: Добавка для роста звездчатых клеток
STeCM: Среда для звездчатых клеток
ТВА: Общий уровень желчных кислот
TGFβ1: Фактор роста опухоли бета 1
TGFBRI: рецептор TGFb типа I
TGFBRII: рецептор TGFb типа II
THBS1: Тромбоспондин 1
TMB: Тетраметилбензидин

TZ: Тизоксанид

TZG: Тизоксанида глюкуронид

TZ (G): TZ или TZG

Фигура 1. Нитазоксанид и его метаболит тизоксанид ингибируют индуцируемую TGF β 1 экспрессию белка α -SMA в HSC человека

Лишенные сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с NTZ (A) или TZ (B), а затем проводили активацию профиброгенным цитокином TGF β 1 (1 нг/мл). После инкубации в течение 48 часов экспрессию α -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 1 нг/мл)]. Аппроксимацию кривой и вычисление полумаксимальной ингибиторной концентрации (IC₅₀) проводили с использованием программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

Фигура 2. Нитазоксанид и его метаболит тизоксанид снижают уровень транскриптов COL1A1 в индуцированных TGF β 1 HSC человека

Лишенные сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с NTZ (A) или TZ (B), а затем проводили активацию TGF β 1 (1 нг/мл). После инкубации в течение 24 часов экспрессию COL1A1 количественно определяли посредством ОТ-кПЦР. Уровни экспрессии переводили в кратность индукции относительно контроля TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 1 нг/мл)].

Фигура 3: NTZ (A) или TZ (B) ингибируют индуцируемую TGF β 1

экспрессию белка α -SMA в HSC крысы.

NTZ (A) или TZ (B) добавляли к лишенным сыворотки HSC крысы (rHSC) за 1 час до активации посредством TGF β 1 (3 нг/мл). После инкубации в течение 48 часов экспрессию α -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 3 нг/мл)].

Фигура 4: NTZ (A) или TZ (B) ингибируют индуцируемую TGF β 1 экспрессию белка α -SMA в фибробластах легкого человека.

NTZ (A) или TZ (B) добавляли к лишенным сыворотки фибробластам легкого (NHLF) за 1 час до активации посредством TGF β 1 (1 нг/мл). После инкубации в течение 48 часов экспрессию α -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 1 нг/мл)].

Фигура 5: NTZ (A) или TZ (B) ингибируют индуцируемую TGF β 1 экспрессию белка α -SMA в фибробластах сердца человека.

NTZ (A) или TZ (B) добавляли к лишенным сыворотки фибробластам сердца (NHCF) за 1 час до активации посредством TGF β 1 (3 нг/мл). После инкубации в течение 48 часов экспрессию α -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно

контроля с TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 3 нг/мл)].

Фигура 6: NTZ (A) или TZ (B) ингибируют индуцируемую TGF β 1 экспрессию белка α -SMA в фибробластах кишечника человека.

NTZ (A) или TZ (B) добавляли к лишенным сыворотки фибробластам кишечника (InMyoFib) за 1 час до активации посредством TGF β 1 (3 нг/мл). После инкубации в течение 48 часов экспрессию α -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF β 1. Данные представлены в качестве среднего значения (для трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA, а затем апостериорного критерия Бонферрони, с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (сравнение против группы TGF β 1 3 нг/мл)].

Фигура 7: Хроническое пероральное введение нитазоксанида (10 мг/кг/сутки) препятствует индуцируемому CDAA накоплению коллагена в печени мышей C57Bl/6J.

Мышей C57BL/6 в возрасте 6 недель кормили контрольным рационом (CSAA), рационом CDAA+1% CHOL (CDAAc) или рационом CDAAc с дополнением 10 мг/кг/сутки NTZ в течение 12 недель. После умерщвления определяли содержание коллагена в печени. Данные представлены в качестве среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0: CSAA против CDAAc (# : $p < 0,05$; ## : $p < 0,01$; ### : $p < 0,001$) и CDAAc против NTZ 10 мг/кг/сутки (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Фигура 8: Длительное пероральное введение нитазоксанида (10 мг/кг/сутки) препятствует индуцируемому рационом с CDAAs фиброзу в печени мышей C57Bl/6J.

Мышей C57BL/6 в возрасте 6 недель кормили контрольным рационом (CSAA), рационом CDAAs или рационом CDAAs с дополнением 10 мг/кг/сутки NTZ в течение 12 недель. После умерщвления определяли фиброз печени. Данные представлены в качестве среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0: CSAA против CDAAs (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) и CDAAs против NTZ 10 мг/кг/сутки (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Фигура 9: длительное пероральное введение нитазоксанида препятствует индуцируемым CCl4 уровням концентрации циркулирующего ТВА.

Крысам массой 250–275 внутрибрюшинно инъецировали оливковое масло (контрольная группа) или CCl₄, эмульгированный в оливковом масле (CCl₄:оливковое масло 1:2 об./об., конечная концентрация CCl₄: 2 мл/кг) два раза в неделю в течение 3 недель. Одновременно группе, в которой инъецировали оливковое масло, начинали давать контрольный рацион, в то время как в группах, в которых инъецировали CCl₄, начинали давать контрольный рацион или рацион, дополненный NTZ 10 мг/кг/сутки или 30 мг/кг/сутки. После умерщвления определяли концентрацию циркулирующего ТВА. Данные представлены в качестве среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили посредством t-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0: оливковое масло против CCl₄ (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) и CCl₄ против NTZ (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В экспериментальной части настоящей заявки показано, что соединения [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил] фенил] этаноат (нитазоксанид) и 2-гидрокси-N-(5-нитро-2-тиазолил) бензамид (тизоксанид) обладают противофиброзными свойствами в нескольких

моделях фиброза. Более того, показано, что NTZ или его активный метаболит TZ обладают способностью препятствовать появлению измененных уровней циркулирующих желчных кислот в модели повреждения печени, демонстрируя способность NTZ и TZ лечить холестатические заболевания. Таким образом, настоящее изобретение относится к новым терапевтическим применениям соединения NTZ или его активного метаболита, такого как TZ или TZG.

В частности, настоящее изобретение относится к соединению NTZ или TZ(G), или к фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения. Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей NTZ или TZ(G), или их фармацевтически приемлемую соль, для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения. Более того, изобретение относится к применению NTZ или TZ(G), или их фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства, пригодного для лечения холестатического или фибротического нарушения. Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей NTZ или TZ(G), или их фармацевтически приемлемую соль. Фармацевтическая композиция по изобретению пригодна для лечения холестатического или фибротического нарушения.

Хотя этиологические факторы или инициирующие события фибротических нарушений являются довольно разнообразными и их патогенез варьируется, общим признаком пораженных тканей является присутствие больших количеств активированных фибробластов, называемых миофибробластами ((Rosenbloom, Mendoza *et al.*, 2013)). Стимул фиброза, такой как TGF β 1, может индуцировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты (Leask and Abraham, 2004; Leask, 2007). Миофибробласты представляют собой метаболически и морфологически отличимые фибробласты, активация и пролиферация которых играет ключевую роль в развитии фибротического ответа. Более того, эти миофибробласты проявляют уникальные биологические функции,

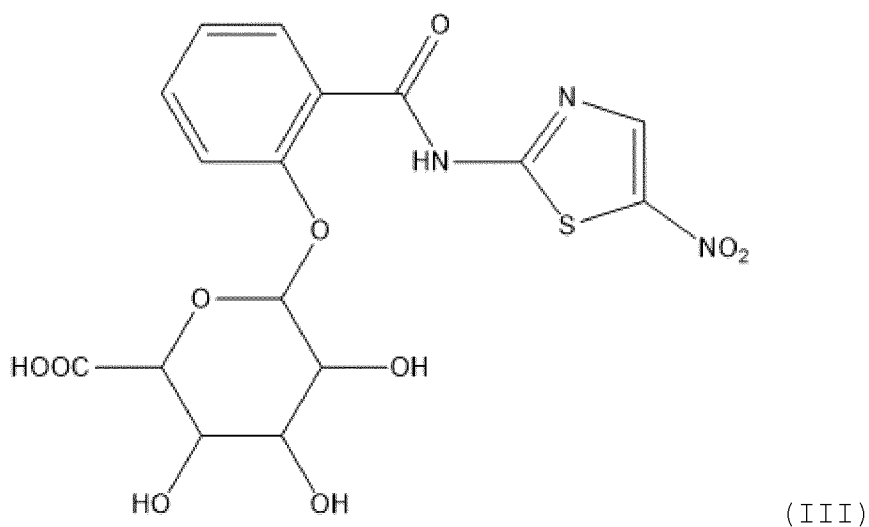
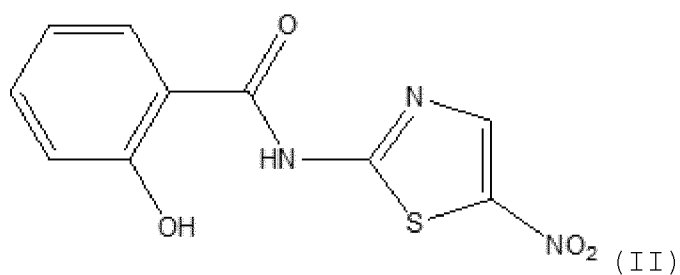
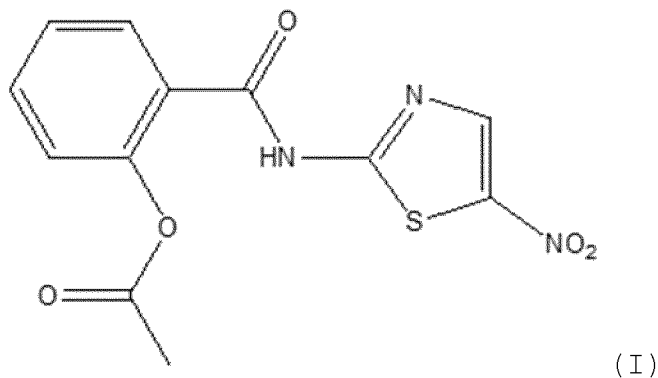
включая экспрессию белков, вовлеченных в образование внеклеточного матрикса, таких как различные формы коллагена, фибронектин и другие белки ЕСМ. Индукция экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA) является общепризнанным признаком дифференцировки покоящихся фибробластов в активированные миофибробласты, и ее можно использовать в качестве физиологического показателя для оценки эффективности лекарственных средств, препятствующих фибротическому процессу. Факторы роста опухоли β и особенно фактор роста опухоли бета 1 (TGF β 1) являются общепризнанными физиологическими сигналами, которые индуцируют фенотипическую трансформацию фибробластов в профибротические миофибробласты, которые экспрессируют высокие уровни α -SMA и высокие уровни белков внеклеточного матрикса, которые затем секретируются и формируют фиброзную рубцовую ткань.

Более того, известно, что пролиферация и активация фибробластов ответственна за продукцию нескольких компонентов соединительной ткани (например, коллагены, эластин, протеогликаны и гиалуронан), которые составляют внеклеточный матрикс (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

Неожиданно, NTZ, а также его активный метаболит TZ, продемонстрировали противofiброзные свойства, поскольку эти соединения дозозависимым образом снижали уровень α -SMA в индуцированных TGF β звездчатых клетках печени и в первичных фибробластах из других органов. Более того, обработка NTZ или TZ также снижала экспрессию коллагена (Colla1) в активированных TGF β HSC крысы, что подтверждает противofiброзные свойства обеих молекул. Противofiброзная активность NTZ или его метаболита TZ также была продемонстрирована *in vivo* с использованием модели индуцированного CDAAc фиброза печени, в которой было проиллюстрировано сниженное содержание коллагена печени и уменьшенная площадь фиброза. Более того, в модели индуцированного CCl4 повреждения печени было показано, что NTZ или его активный метаболит TZ могли препятствовать индукции уровней циркулирующих желчных кислот, являющихся маркером

холестатических заболеваний.

NTZ, TZ и TZG для применения в рамках изобретения имеют следующие формулы (I), (II) и (III), соответственно:



NTZ и TZ известны вследствие их противопаразитарной и противовирусной активности, однако в документах уровня техники не описано, что NTZ, TZ и TZG обладают антихолестатическими и противофиброзными эффектами.

Авторы изобретения продемонстрировали новым и изобретательским путем, что эти соединения обладают терапевтическим эффектом при лечении холестаза или фиброза.

Таким образом, изобретение относится к соединению NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), для применения в способе лечения холестатического или фибротического

нарушения.

В следующем аспекте изобретение относится к NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), для применения для ингибирования пролиферации и/или активации фибробластов. Как известно в данной области, фибробласты ответственны за продукцию коллагеновых волокон и других компонентов соединительной ткани во внеклеточном матриксе.

В соответствии с настоящим изобретением, термины "фиброз", "фибротическое заболевание", "фибротическое нарушение" и их склонения обозначают патологическое состояние чрезмерного накопления фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Более конкретно, фиброз является патологическим процессом, который включает постоянное образование фиброзных рубцов и сверхпродукцию внеклеточного матрикса соединительной ткани в ответ на повреждение ткани. Физиологически накопление соединительной ткани может нарушать архитектуру и функцию соответствующего органа или ткани.

В соответствии с настоящим изобретением, фиброз или фибротическое нарушение могут быть ассоциированы с фиброзом любого органа или ткани. Иллюстративные неограничивающие примеры фиброза конкретного органа включают фиброз печени, кишечного тракта, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов, и желудка, в частности, фиброз печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка.

В соответствии с настоящим изобретением, термины "холестаз", или "холестатическое заболевание", или

"холестатическое нарушение" и его склонения обозначают патологическое состояние, определяемое снижением тока желчи вследствие нарушения секреции гепатоцитами или препятствования току желчи через внутрипеченочные и внепеченочные желчные протоки. Таким образом, клиническим определением холестаза является любое состояние, при котором вещества, обычно экскретируемые в желчь, задерживаются.

В конкретном варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечного тракта, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, кишечника и суставов (например, коленного, плечевого или других суставов).

В предпочтительном варианте осуществления фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легкого, кожи, почки и кишечника.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подвергаемое лечению фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из следующего неполного перечня фибротических нарушений: неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз легких, идиопатический фиброз легких, фиброз кожи, фиброз глаз, эндомикардиальный фиброз, средостенный фиброз, миелофиброз, забрюшинный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз (осложнение пневмокониоза шахтеров), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, фиброз легких после хронического воспалительного заболевания легких (COPD, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез), алкогольный или индуцируемый лекарственными средствами фиброз печени, цирроз печени, индуцируемый инфекцией фиброз печени, индуцируемый радиацией или химиотерапией фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермия/системная склеродермия, артрофиброз, некоторые формы адгезивного капсулита, хронические фиброзирующие холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC) и первичный билиарный холангит (PBC), атрезия желчных протоков, семейный внутрипеченочный холестаз 3 типа (PFIC3),

периимплантационный фиброз и асбестоз.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения, холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутрипеченочного холестаза при беременности, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, атрезии желчных протоков, холелитиаза, инфекционного холангита, холангита, ассоциированного с гистиоцитозом из клеток Лангерганса, синдрома Алажилля, внесиндромной недостаточности протоков, индуцируемого лекарственными средствами холестаза и ассоциированного с полным парентеральным питанием холестаза. В предпочтительном варианте осуществления холестатическое заболевание представляет собой PBC или PSC, в частности, PBC.

Термин "лечение" или "лечащий" относится к направленному на излечение или профилактическому лечению холестатического или фибротического нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом. Лечение вовлекает введение соединения, в частности, содержащегося в фармацевтической композиции, индивидууму, имеющему установленное нарушение, т.е. пациенту, для излечения, отсрочивания, обращения вспять или замедления прогрессирования нарушения, тем самым улучшая состояния индивидуума. Лечение также можно проводить у индивидуума, который является здоровым или имеет риск развития холестатического или фибротического нарушения, для предупреждения или отсрочивания нарушения.

Таким образом, согласно изобретению, лечение фибротического нарушения вовлекает введение NTZ или TZ (G), или их фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей их, индивидууму, имеющему установленное нарушение, для излечения, отсрочивания, обращения вспять или замедления прогрессирования нарушения, таким образом, улучшая состояние пациента, или здоровому индивидууму, в частности, индивидууму, имеющему риск развития холестатического или фибротического нарушения.

Индивидуумом, подвергаемым лечению, является млекопитающее, предпочтительно человек. Индивидуум, подвергаемый лечению согласно изобретению, может быть выбран, исходя из нескольких

критериев, ассоциированных с холестатическими или фибротическими заболеваниями, таких как предшествующее лечение лекарственными средствами, ассоциированные патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также исходя из обнаружения какого-либо значимого биомаркера, который можно оценивать способами визуализации и иммунологическими, биохимическими, ферментативными, химическими способами, или способами обнаружения нуклеиновых кислот.

Синтез NTZ или TZ можно проводить, например, как описано Rossignol and Cavier, 1975, или любым другим способом синтеза, известным специалисту в данной области. TZG можно синтезировать, например, любым способом синтеза, известным в данной области, таким как в Wadouachi 2011. S'agit-il de A Wadouachi, J Kovensky, Synthesis of Glycosides of Glucuronic, Galacturonic and Mannuronic Acids: An Overview, *Molecules*, 2011, 16(5), 3933-3968.

В конкретном варианте осуществления лечение холестатического или фибротического нарушения может включать введение комбинации как NTZ, так и TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ и TZ(G). Согласно варианту этого варианта осуществления, как NTZ, так и TZ(G) содержатся вместе в одной композиции.

В другом варианте этого варианта осуществления NTZ и TZ(G) предназначены для одновременного, последовательного или раздельного введения при терапии, таким образом, они могут быть включены в различные композиции. В случае последовательного введения, NTZ можно вводить до введения TZ(G), или TZ(G) можно вводить до введения NTZ. По существу, изобретение также относится к набору, содержащему (i) NTZ или его фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическую композицию, содержащую NTZ или его фармацевтически приемлемую соль; и (ii) TZ(G) или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию, содержащую TZ(G) или его фармацевтически приемлемую соль, для одновременного, последовательного или раздельного введения.

NTZ или TZ(G) можно составлять в качестве фармацевтически приемлемых солей, в частности кислых или основных солей,

совместимых с фармацевтическим применением. Соли NTZ и TZ(G) включают фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и соли алкилированного аммония. Эти соли можно получать на конечной стадии очистки соединения или путем включения соли в ранее очищенное соединение.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, выбранное из NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), для применения в способе лечения холестатического или фибротического заболевания.

Фармацевтическая композиция, содержащая NTZ или TZ(G), в частности, для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения, также может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей (например, солевые растворы, физиологические растворы, изотонические растворы и т.д., совместимые с фармацевтическим применением и хорошо известные специалисту в данной области).

Эти композиции, кроме того, могут содержать одно или несколько средств или носителей, выбранных из диспергирующих средств, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов и т.д. Средства или носители, пригодные для этих составов (жидкие, и/или инъекционные, и/или твердые), в частности, представляют собой метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полисорбат 80, маннит, желатин, лактозу, растительные масла, гуммиарабик, липосомы и т.д.

Эти композиции можно составлять в форме инъекционных суспензий, сиропов, гелей, масел, мазей, пилюль, таблеток, суппозиторий, порошков, желатиновых капсул, капсул, аэрозолей и т.д., наконец, посредством галеновых форм или устройств, обеспечивающих пролонгированное и/или замедленное высвобождение. Для составов этого типа предпочтительно можно использовать такие средства, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

NTZ или TZ(G) можно вводить различными путями и в различных формах. Например, соединение(я) можно вводить системным путем,

перорально, парентерально, ингаляционным путем, посредством назального спрей, посредством вливания через нос, или путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечным путем, подкожным путем, трансдермальным путем, местным путем, внутриартериальным путем и т.д.

Безусловно, путь введения будет адаптирован к форме NTZ или TZ(G) по методикам, хорошо известным специалистам в данной области.

В конкретном варианте осуществления соединение составлено в качестве таблетки. В другом конкретном варианте осуществления соединение вводят перорально.

NTZ или TZ(G), или их фармацевтически приемлемую соль, вводят в терапевтически эффективном количестве. В контексте изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, достаточному для обеспечения желаемого терапевтического эффекта.

Частота и/или доза для введения могут быть адаптированы специалистом в данной области, в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, NTZ или TZ(G) можно вводить для лечения холестатического или фибротического заболевания в дозе, составляющей от 0,01 мг/сутки до 4000 мг/сутки, как например, от 50 мг/сутки до 2000 мг/сутки, такой как от 100 мг/сутки до 2000 мг/сутки; и, в частности, от 100 мг/сутки до 1000 мг/сутки. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе приблизительно 1000 мг/сутки (т.е. в дозе от 900 до 1100 мг/сутки), в частности, в дозе 1000 мг/сутки. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе приблизительно 1000 мг/сутки, в частности, 1000 мг/сутки, в частности, в виде таблетки. Введение можно проводить каждые сутки или при необходимости даже несколько раз в сутки. В одном варианте осуществления соединения вводят по меньшей мере один раз в сутки, например, один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В конкретном варианте осуществления соединения вводят один раз в сутки или два раза в сутки. В частности, пероральное

введение можно проводить один раз в сутки в ходе приема пищи, например, во время завтрака, обеда или ужина, путем приема таблетки, содержащей соединение в дозе приблизительно 1000 мг, в частности, в дозе 1000 мг. В другом варианте осуществления таблетку вводят перорально два раза в сутки, например, путем введения первой таблетки, содержащей соединение в дозе приблизительно 500 мг (т.е. в дозе от 450 до 550 мг), в частности, в дозе 500 мг, во время одного приема пищи, и введения второй таблетки, содержащей соединение, в дозе приблизительно 500 мг, в частности, в дозе 500 мг, во время другого приема пищи в тот же день.

В подходящем случае курс лечения NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемой солью составляет по меньшей мере 1 неделю, в частности, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 24 недели или более. В частности, курс лечения NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемой солью составляет по меньшей мере 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или по меньшей мере 5 лет.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к лечению холестатического или фибротического заболевания, в частности, фиброза печени, более конкретно, фиброза печени после NASH, у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), в частности, введение NTZ в дозе 1000 мг/сутки, в частности, путем приема таблетки, содержащей 500 мг NTZ, два раза в сутки, в частности, во время двух различных приемов пищи.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к применению NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), для лечения холестатического или фибротического заболевания в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтически активным средством с известной противофиброзной активностью. Согласно варианту этого варианта осуществления, NTZ или TZ(G) можно комбинировать с любым противофиброзным соединением, таким как пирфенидон или ингибиторы рецепторных тирозинкиназ (RTKI), такие как нинтеданиб, сорафениб и другие

RTKI, или блокаторы рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитор CTGF, или любое противофиброзное соединение, связанное с препятствованием активируемым TGF β и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корорецепторы (также известные как рецепторы типа III), или компоненты SMAD-зависимого канонического каскада, включающего регуляторные или ингибиторные белки SMAD, или представители независимых от SMAD или неканонических каскадов, включая различные ветви передачи сигнала MAPK, TAK1, каскады передачи сигнала Rho-подобной GTP-азой, каскады фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, TGF β -индуцируемый процесс EMT или канонические и неканонические каскады передачи сигнала Hedgehog, включающие лиганды Hh или гены-мишени, или любые представители каскадов WNT или Notch, которые подвержены влиянию передачи сигнала TGF β .

Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, выбранное из NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством с известной противофиброзной активностью, выбранным из пирфенидона или ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого противофиброзного соединения, связанного с препятствованием активируемым TGF β и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корорецепторы (также известные как рецепторы типа III), или компоненты SMAD-зависимого канонического каскада,

включающего регуляторные или ингибиторные белки SMAD, или представители независимых от SMAD или неканонических каскадов, включая различные ветви передачи сигнала MAPK, TAK1, каскады передачи сигнала Rho-подобной GTP-азой, каскады фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, TGF β -индуцируемый процесс EMT или канонические и неканонические каскады передачи сигнала Hedgehog, включающие лиганды Nn или гены-мишени, или любые представители каскадов WNT или Notch, которые подвержены влиянию передачи сигнала TGF β , для применения в способе лечения фибротического нарушения.

В другом конкретном варианте осуществления другие классы молекул, которые можно комбинировать с NTZ или TZ(G), включают ингибиторы JAK/STAT или другие противовоспалительные средства и/или иммунодепрессанты. Неполный перечень этих средств включает, но не ограничивается ими, глюкокортикоиды, NSAID, циклофосфамид, нитрозомочевину, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пуринов, аналоги пиримидинов, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин, мириоцин, такролимус, сиролимус, производные микофеноловой кислоты, финголимод и другие модуляторы рецепторов сфингозин-1-фосфата, моноклональные и/или поликлональные антитела против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, Т-клеточный рецептор, интегрины. Другие классы молекул, которые также можно комбинировать с NTZ или TZ(G), включают молекулы, которые потенциально могут усиливать экспозицию или эффект NTZ или TZ(G).

В другом конкретном варианте осуществления изобретение относится к комбинации NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним другим терапевтически активным средством с известной противофиброзной активностью, или с ингибиторами JAK/STAT, или с другими противовоспалительными средствами и/или иммунодепрессантами. Комбинация может быть в форме одной фармацевтической композиции, содержащей различные активные ингредиенты, включая NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте комбинация представляет собой

набор, содержащий NTZ, TZ(G) или их фармацевтически приемлемую соль, и другой активный ингредиент, такой как другое противофиброзное средство, ингибитор JAK/STAT или другое противовоспалительное средство или иммунодепрессант. Указанный набор может быть предназначен для одновременного, отдельного или последовательного введения для лечения холестатического или фибротического нарушения.

В другом варианте осуществления, соединение NTZ или TZ(G), или комбинацию NTZ и TZ(G), вводят в качестве единственного активного ингредиента. Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, выбранное из NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемую соль NTZ или TZ(G), или их смесь, для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения, где указанное соединение(я) является единственным активным ингредиентом(ами) в композиции.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения холестатических или фибротических заболеваний, включающим введение NTZ или TZ(G), или фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ(G), в частности, в форме фармацевтической композиции, содержащей NTZ или TZ.

В другом аспекте изобретение относится к набору, содержащему:

- Нитазоксанид или фармацевтически приемлемую соль нитазоксанида; и
- тизоксанид или фармацевтически приемлемую соль тизоксанида.
- Соединения набора по изобретению вводят одновременно, по отдельности или последовательно для лечения фибротического нарушения.
- В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения холестатических и/или фибротических заболеваний, включающему введение два раза в сутки пациенту, нуждающемуся в этом, имеющему холестатическое или фибротическое заболевание (в частности, пациенту с NASH или пациенту, имеющему фиброз печени) таблетки, содержащей 500 мг NTZ, в частности, во время приема

пищи (например, во время завтрака, обеда или ужина).

Изобретение далее описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Fluka, каталожный номер № 41640). Нитазоксанид (INTERCHIM, каталожный номер № RQ550U) и тизоксанид (INTERCHIM, каталожный номер № RP253) получали из коммерческих источников.

Культивирование hHSC

Первичные звездчатые клетки человека (hHSC) (Innoprot) культивировали в среде STeCM (ScienCell, каталожный номер № 5301), которая была дополнена 2% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, ScienCell, каталожный номер № 0010), 1% пенициллином/стрептомицином (ScienCell, каталожный номер № 0503) и добавкой для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, каталожный номер № 5352). Флаконы для культивирования клеток были покрыты поли-L-лизином (Sigma, каталожный номер № P4707) для лучшей адгезии.

Активация hHSC посредством TGF- β 1

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Innoprot) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем клетки высевали с плотностью 7×10^4 клеток/лунка в 24-луночные планшеты для исследований экспрессии генов и с плотностью 2×10^4 клеток/лунка в 96-луночные планшеты для количественного определения α -SMA посредством ELISA. На следующие сутки среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190). hHSC подвергали голоданию в течение 24 часов в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработки NTZ или TZ лишенные сыворотки hHSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGF β 1 (PeproTech, каталожный номер № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде на дополнительные 24 или 48 часов (время указано на легендах фигур). В конце

обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190), а затем добавляли 50 мкл лизирующего буфера (CellLytic™, реагент MT; Sigma #C3228). Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с использованием встряхивателя для планшетов, а затем хранили при -20°C.

Активация HSC крысы посредством TGFβ1:

Первичные звездчатые клетки крысы (rHSC) (Innoprot) культивировали в среде STeCM (ScienCell, каталожный номер № 5301), которая была дополнена 2% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, ScienCell, каталожный номер № 0010), 1% пенициллином/стрептомицином (ScienCell, каталожный номер № 0503) и добавкой для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, каталожный номер № 5352). Для экспериментов по активации посредством TGFβ1, rHSC высевали с плотностью 10×10^3 клеток на лунку в 96-луночные планшеты. На следующие сутки среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190). rHSC подвергали голоданию в течение 24 часов в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработки NTZ или TZ лишенные сыворотки rHSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGFβ1 (PeproTech, каталожный номер № 100-21, 3 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде на дополнительные 48 часов. В конце обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190), а затем добавляли 50 мкл лизирующего буфера (CellLytic™, реагент MT; Sigma #C3228). Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с использованием встряхивателя для планшетов, а затем хранили при -20°C.

Активация NHLF посредством TGFβ1

Нормальные фибробласты легкого человека (NHLF) (Lonza) культивировали в базальной среде для фибробластов (FBM) (Lonza, каталожный номер № CC-3131), которая была дополнена набором FGM-2 SingleQuots™ (Lonza, каталожный номер № CC-3132). Полная среда содержит 2% эмбриональную телячью сыворотку. Для экспериментов по активации посредством TGFβ1, NHLF высевали с плотностью 5×10^3

клеток на лунку в 96-луночные планшеты. На следующие сутки среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190). NHLF подвергали голоданию в течение 24 часов в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-В среде. Для обработки NTZ или TZ лишенные сыворотки NHLF предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGF β 1 (PeproTech, каталожный номер № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-В среде на дополнительные 48 часов. В конце обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190), а затем добавляли 50 мкл лизирующего буфера (CellLytic™, реагент MT; Sigma #C3228). Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с использованием встряхивателя для планшетов, а затем хранили при -20°C.

Активация NHCF-V посредством TGF β 1:

Нормальные фибробласты сердца человека (желудочек) (NHCF-V) (Lonza) выделяли из нормальной ткани взрослого сердца. Клетки культивировали в базальной среде для фибробластов (FBM) (Lonza, каталожный номер № CC-3131), дополненной набором FGM™-3 BulletKit™ (Lonza, каталожный номер № CC-4525). Полная среда содержит 10% эмбриональную телячью сыворотку. Для экспериментов по активации посредством TGF β 1, NHCF-V высевали с плотностью 6×10^3 клеток на лунку в 96-луночные планшеты. На следующие сутки среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190). NHCF-V подвергали голоданию в течение 24 часов в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-В среде. Для обработки NTZ или TZ лишенные сыворотки NHCF предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGF β 1 (PeproTech, каталожный номер № 100-21, 3 нг/мл) в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-В среде на дополнительные 48 часов. В конце обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190), а затем добавляли 50 мкл лизирующего буфера (CellLytic™, реагент MT;

Sigma #C3228). Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с использованием встряхивателя для планшетов, а затем хранили при -20°C .

Активация inMyoFib посредством TGF β 1:

Миофибробласты кишечника человека (inMyoFib) (Lonza) культивировали в базальной среде для гладкомышечных клеток (SmBM-2TM) (Lonza, каталожный номер № CC-3181), дополненной SmGMTM-2 BulletKit TM (Lonza, каталожный номер № CC-4149). Полная среда содержит 5% эмбриональную телячью сыворотку. Для экспериментов по активации посредством TGF β 1, inMyoFib высевали с плотностью 10×10^3 клеток на лунку в 96-луночные планшеты. На следующие сутки среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190). inMyoFib подвергали голоданию в течение 24 часов в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-B среде. Для обработки NTZ или TZ лишенные сыворотки inMyoFib предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGF β 1 (PeproTech, каталожный номер № 100-21, 3 нг/мл) в бессывороточной, не содержащей инсулина и не содержащей rhFGF-B среде на дополнительные 48 часов. В конце обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный номер № 14190), а затем добавляли 50 мкл лизирующего буфера (CellLyticTM, реагент MT; Sigma #C3228). Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин на льду с использованием встряхивателя для планшетов, а затем хранили при -20°C .

ELISA для α -SMA

Уровень α -SMA количественно определяли с использованием сэндвич-ELISA. В кратком изложении, стенки планшета для ELISA сначала покрывали антителом для улавливания (моноклональное антитело мыши против ACTA2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывания в PBS+0,2% Tween 20 добавляли блокирующий раствор, состоящий из PBS+0,2% BSA, на один час, а затем проводили другой цикл промывания. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с антителом для улавливания на 2 ч при комнатной

температуре. После процедуры промывания добавляли антитело для обнаружения (биотинилированное моноклональное антитело мыши против АСТА2, Abnova) на 2 часа при комнатной температуре, а затем проводили 3 промывания. Для обнаружения сначала наносили конъюгированный с HRP стрептавидин (R&D Systems, каталожный номер № DY998) в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывания добавляли TMB (BD, #555214), являющийся субстратом HRP, и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. При окислении TMB образует растворимый в воде синий продукт реакции, который становится желтым при добавлении серной кислоты (стоп-раствор), что позволяет точное измерение интенсивности при 450 нм с использованием спектрофотометра. Развившаяся окраска прямо пропорциональна количеству α -SMA, присутствующего в лизате.

Экспрессия генов

Тотальную РНК выделяли с использованием Nucleospin® 96 RNA (Macherey Nagel) в соответствии с инструкциями изготовителя. Тотальную РНК (500 нг для образцов *in vitro*) подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV RT (обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони) (Invitrogen, каталожный номер № 28025) в 1× буфере для RT (Invitrogen), 1 mM DTT (Invitrogen), 0,18 mM dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Amersham) и 30 Е ингибитора РНК-азы (Promega).

Затем проводили ПЦР с использованием системы MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad). В кратком изложении, реакции ПЦР проводили в формате 96-WP в общем объеме 25 мкл, содержащем 1 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции, 0,5 мкл обратного и прямого праймеров (по 10 пмоль каждого) и 12,5 мкл 2X iQ SYBR Green Supermix (BioRad, 1725006CUST). Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1: Праймеры для последовательностей человека

Название праймера	Последовательность (5'→3')
36B4, прямой	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC (SEQ ID NO:1)

36B4, обратный	GGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG (SEQ ID NO:2)
COL1A1, прямой	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO:3)
COL1A1, обратный	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO:4)

Уровни экспрессии нормализовывали с использованием экспрессии гена 36B4 в качестве эталона в образцах человека.

Для каждого гена строили стандартные кривые путем выбора наилучших точек (по меньшей мере три точки), чтобы эффективность реакции ПЦР приближалась к 100% и коэффициент корреляции приближался к 1. Уровни экспрессии определяли с использованием уравнения для стандартной кривой как для гена домашнего хозяйства, так и для гена-мишени (учитывая эффективность конкретной ПЦР для каждого гена-мишени).

Оценка NTZ в модели хронического индуцированного рационом с CDAAs фиброза печени

Противофиброзный эффект NTZ оценивали в модели индуцируемого рационом с CDAAs экспериментального фиброза печени на мышах. Мышей C57BL/6 в возрасте 6 недель кормили в течение 12 недель контрольным рационом (CSAA), рационом с CDAAs или рационом с CDAAs, дополненным NTZ, 10 мг/кг/сутки, в течение 12 недель.

Мониторинг массы тела и приема пищи проводили два раза в неделю. В последний день введения мышей умерщвляли после периода голодания, длившегося 6 ч. Печень сразу извлекали для биохимических и гистологических исследований.

Все процедуры на животных проводили в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных.

Оценка NTZ в модели индуцированного CCl4 повреждения печени

Противофиброзный эффект NTZ оценивали в модели индуцированного CCl4 повреждения печени на крысах.

Крыс OFA S;Dawley (исходная масса тела 250-275 г) случайным

образом распределяли в соответствии с их массой тела в 4 группы и лечили в течение 3 недель. Крысам внутрибрюшинно инъецировали оливковое масло (контрольная группа) или CCl₄, эмульгированный в оливковом масле (CCl₄:оливковое масло 1:2 об./об., конечная концентрация CCl₄: 2 мл/кг) два раза в неделю. Одновременно в группе, в которой инъецировали оливковое масло, начинали контрольный рацион, в то время как в группах, в которых инъецировали CCl₄, начинали контрольный рацион или рацион, дополненный NTZ. Использовали 2 режима, включающих NTZ, для воздействия 10 или 30 мг/кг/сутки. На последние сутки лечения крыс умерщвляли после периода голодания, длившегося 6 ч. Проводили взятие образцов крови и выделение сыворотки для биохимических анализов.

Оценка NTZ в модели холестаза с DDC:

Мышей C57BL/6 кормят в течение 8 недель рационом, дополненным 0,1% DDC, или рационом, дополненным 0,1% DDC, включающим NTZ 100 мг/кг/сутки, или стандартным рационом для мышей (Ssniff). В последний день введения мышей умерщвляют после периода голодания, длящегося 6 ч. Проводят взятие образцов крови для биохимического анализа и печень сразу извлекают для биохимических и гистологических исследований.

Оценка NTZ в модели хронического индуцированного CCl₄ фиброза печени

Мышам C57BL/6 в возрасте 9 недель дают контрольный рацион или рацион, дополненный NTZ, в течение 6 недель. Используют 2 режима, включающих NTZ, для воздействия 30 или 100 мг/кг/сутки. Одновременно и на протяжении всех 6 недель мышам вводят 3 раза в неделю CCl₄, растворенный в оливковом масле, или носитель, через пероральный зонд. Количество CCl₄ постепенно повышают от 0,875 мл/кг до 2,5 мл/кг. В последний день введения мышей умерщвляют после периода голодания, длящегося 6 ч. Проводят взятие образцов крови для биохимического анализа сыворотки. Печень сразу извлекают для биохимических, гистологических исследований и исследований экспрессии.

Гистология

Заливка и получение срезов тканей:

Срезы печени сначала фиксировали в течение 12 часов в 4% растворе формалина. Затем фрагменты печени промывали в течение 30 минут в PBS и дегидратировали в растворах этанола (последовательные ванны с 70, 80, 95 и 100% этанолом). Фрагменты печени инкубировали в трех различных ваннах с ксилолом (Sigma-Aldrich, каталожный номер № 534056), а затем в двух ваннах с вазелиновым маслом (56°C). Затем фрагменты печени помещали в подставки, которые осторожно заполняли Histowax® до полного покрытия ткани.

Парафиновые блоки, содержавшие фрагменты тканей, извлекали из подставок и хранили при комнатной температуре. Блоки печени нарезали на срезы толщиной 3 мкм.

Окрашивание пикросириусом красным

Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в течение 15 минут в растворе Fast Green FCF 0,1% (Sigma-Aldrich, каталожный номер № F7258) перед промыванием в ванне с 0,5% уксусной кислотой (Panreac, каталожный номер № 131008,1611). Срезы печени ополаскивали водой и инкубировали в течение 30 минут в растворе 0,1% сириуса красного (Direct Red 80, Fluka, каталожный номер 43665) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты (Sigma-Aldrich, каталожный номер № P6744). Наконец, срезы печени дегидратировали и заливали с использованием среды CV Mount medium (Leica, каталожный номер № 14046430011).

Гистологические исследования

Тип образца печени был неизвестен исследователю. Виртуальные препараты получали с использованием сканера Panoramic 250 jn 3D Histech. С использованием программного обеспечения Quant Center (3D Histech, включающее модули Pattern Quant и Histo Quant) проводили количественное определение окрашенных коллагеном областей. В кратком изложении, Pattern Quant использовали для обнаружения соответствующей структуры ткани и для количественного определения поверхности. Затем Histo Quant использовали для обнаружения содержания окрашенного коллагена и для количественного определения общей площади и

процентов согласно способу цветового порога. Площадь фиброза выражали в качестве процента коллагеновой поверхности относительно всей ткани.

Количественное определение содержания коллагена в печени

Содержание коллагена в печени определяли с использованием соответствующего набора QuickZyme kit (анализ общего коллагена, каталожный номер № QZB-totcol2). Анализ основан на обнаружении гидроксипролина, который является непротеиногенной аминокислотой, в основном встречающейся в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в гидролизатах тканей можно использовать в качестве прямого показателя количества коллагена, присутствующего в ткани (без различия проколлагена, зрелого коллагена и продуктов деградации коллагена).

Перед введением гидроксипролина требуется полный гидролиз образцов тканей в 6 М HCl при 95°C. Анализ приводит к образованию хромогена с максимальным поглощением при 570 нм. Результаты выражают в мг коллагена/г печени.

Оценка NTZ в модели BDL

Хирургическое лигирование желчных протоков проводят на крысах для индукции внепеченочного холестаза, а затем фиброза печени. После восстановления в течение 2 недель животным вводят NTZ в дозе 30 или 100 мг/кг/сутки в течение одной или двух недель. В последний день введения мышей умерщвляют после периода голодания, длящегося 6 ч. Образцы крови собирают для биохимического анализа сыворотки. Печень сразу извлекают для биохимических, гистологических исследований и исследований экспрессии.

Количественное определение концентрации общих желчных кислот в плазме

Концентрацию общих желчных кислот (TBA) в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автоматического анализатора Daytona (Randox, каталожный номер № BI 3863). В присутствии тио-NAD, фермент 3- α гидроксистероиддегидрогеназа (3- α HSD) конвертирует желчные кислоты в 3-кетостероиды и тио-NADH. Реакция является обратимой

и 3- α HSD может конвертировать 3-кетостероиды и тио-NADPH в желчные кислоты и тио-NAD. В присутствии избытка NADH эффективно происходит кругооборот фермента, и скорость образования тио-NADH определяют путем количественного определения специфического изменения поглощения при 405 нм. Результаты выражают в мкмоль/л.

Результаты и заключения:

Аномальное присутствие дифференцированных миофибробластов является признаком многих фибротических заболеваний. После повреждения печени покоящиеся HSC претерпевают процесс активации, характеризующийся дифференцировкой в (α -SMA) – положительные миофибробласты. В попытках найти новые противофиброзные молекулы библиотеку одобренных FDA лекарственных средств подвергали фенотипическому скринингу в модели HSC человека, активированных профиброгенным цитокином TGF β 1. Уровни α -SMA, признак фибротических очагов, использовали для оценки эффективности препятствования лекарственными средствами фиброзного процесса. Скрининг привел к идентификации нитазоксанида (NTZ), который дозозависимым образом снижал уровень α -SMA в индуцированных TGF β HSC. В целом, NTZ проявлял IC₅₀ от 0,1 до 3 мкМ (фиг.1A). Поскольку известно, что NTZ быстро гидролизует в активный метаболит тизоксанид (TZ) (Broekhuysen, Stockis et al., 2000), этот метаболит также оценивали в отношении его противофиброзной активности в HSC. TZ продемонстрировал профиль, сходный с исходным лекарственным средством, с IC₅₀ от 0,1 до 3 мкМ (фиг.1B). Другие маркеры стимуляции TGF β снижались обоими соединениями, включая коллаген 1A1 (COL1A1) внеклеточного матрикса (фиг.2). Анализы токсичности подтвердили, что сниженные уровни α -SMA не были следствием токсичности или апоптоза HSC (данные не представлены).

NTZ и TZ также снижали уровни α -SMA в активированных TGF β HSC, происходящих из крысы (фиг.3). Кроме того, противофиброзный потенциал NTZ и TZ распространялся на фибробласты из других тканей, в то числе на нормальные фибробласты легкого человека (NHLF) (фиг.4), нормальные фибробласты сердца человека (фиг.5) и миофибробласты кишечника человека (InMyoFib) (фиг.6). Во всех

этих моделях фиброза NTZ и TZ продемонстрировали значительные противофиброзные эффекты в концентрации 1 мкМ.

Эффективность NTZ *in vivo* оценивали в модели индицируемого CDAA-холестерином экспериментального фиброза печени. Хроническое пероральное введение нитазоксанида в дозе 10 мг/кг/сутки продемонстрировало противофиброзные свойства, отражающиеся значительно более низким содержанием коллагена в печени (фиг.7) и уменьшенной площадью фиброза печени при гистологическом исследовании (фиг.8).

В модели *in vivo* индуцируемого CCl₄ повреждения печени NTZ препятствовал патологическому увеличению концентрации циркулирующего ТВА (фиг.9), который является маркером, ассоциированным с холестазом (Chang 2013).

В заключение, заявитель открыл неожиданную противофиброзную и противохолестатическую активность противопаразитарного средства NTZ. Эти результаты демонстрируют, что NTZ и/или его активный метаболит TZ могут обеспечить терапевтическую пользу при холестатических заболеваниях и множестве типов фибротических заболеваний.

ССЫЛКИ

Broekhuysen, J., A. Stockis, et al. (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(8): 387-394.

de Carvalho, L. P. S., C. M. Darby, et al. (2011). "Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*." *ACS Med. Chem. Lett.* 2(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 849-854.

Di Santo, N. and J. Ehrisman (2014). "A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug." *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 768(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 16-21.

Dubreuil, L., I. Houcke, et al. (1996). "In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms." *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All

Rights Reserved.): 2266-2270.

Finegold, S. M., D. Molitoris, et al. (2009). "Study of the in vitro activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora." *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 281-286.

Fox, L. M. and L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." *Clin. Infect. Dis.* 40(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1173-1180.

Hemphill, A., J. Mueller, et al. (2006). "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections." *Expert Opin. Pharmacother.* 7(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 953-964.

Hoffman, P. S., G. Sisson, et al. (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 868-876.

Kendall, R. T. and C. A. Feghali-Bostwick (2014). "Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators." *Front Pharmacol* 5: 123.

Leask, A. (2007). "TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response." *Cardiovasc Res* 74(2): 207-212.

Leask, A. and D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." *FASEB J* 18(7): 816-827.

Megraudd, F., A. Occhialini, et al. (1998). "Nitazoxanide, a potential drug for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole." *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2836-2840.

Pankuch, G. A. and P. C. Appelbaum (2006). "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other

thiazolides and three other agents against anaerobic species." Antimicrob. Agents Chemother. 50(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1112-1117.

Rosenbloom, J., F. A. Mendoza, et al. (2013). "Strategies for anti-fibrotic therapies." Biochim Biophys Acta 1832(7): 1088-1103.

Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." Antiviral Res. 110(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 94-103.

Rossignol, J. F. and R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S.P.R.L. Phavic, Belg.. 11 pp.

Rossignol, J. F. and H. Maisonneuve (1984). "Nitazoxanide in the treatment of Taenia saginata and Hymenolepis nana infections." Am J Trop Med Hyg 33(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): 511-512.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

<110>	GENFIT	
<120>	СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ХОЛЕСТАТИЧЕСКИХ И ФИБРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	
<130>	B2223PC00	
<160>	4	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	1	
	catgctcaac atctccccct tctcc	25
<210>	2	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	2	
	gggaaggtgt aatccgtctc cacag	25
<210>	3	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	3	
	aggcgaaca ggtgacagag	20
<210>	4	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<400>	4	
	gscagagaaa scagcagag	19

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из группы, состоящей из нитазоксанида (NTZ), тизоксанида (TZ) и тизоксанида глюкуронида (TZG), и фармацевтически приемлемой соли NTZ, TZ или TZG, для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения.

2. Соединение для применения по п.1, которое выбрано из группы, состоящей из NTZ и TZ, и фармацевтически приемлемой соли NTZ или TZ.

3. Соединение для применения по п.1 или 2, содержащееся в фармацевтической композиции.

4. Соединение для применения по любому из п.п.1-3, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из состоящий из фиброза печени, кишечного тракта, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, суставов, глаз и желудка.

5. Соединение для применения по любому из п.п.1-4, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечного тракта, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягких тканей, костного мозга, кишечника и суставов.

6. Соединение для применения по любому из п.п.1-5, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза легких, идиопатического фиброза легких, фиброза кожи, фиброза глаз (такого как фиброз капсулы), эндомиокардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, забрюшинного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза (осложнение пневмокониоза шахтеров), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза легких после хронического воспалительного заболевания дыхательных путей (COPD, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез), алкогольного или индуцируемого лекарственными средствами фиброза печени, цирроза печени, индуцируемого

инфекцией фиброза печени, индуцируемого радиацией или химиотерапией фиброза, нефрогенного системного фиброза, болезни Крона, язвенного колита, келоида, перенесенного инфаркта миокарда, склеродермии/системной склеродермии, артрофиброза, некоторых форм адгезивного капсулита, хронических фиброзирующих холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), атрезия желчных протоков, семейный внутрипеченочный холестаз 3 типа (PFIC3), периимплантационного фиброза и асбестоза.

7. Соединение для применения по любому из п.п.1-3, где холестатическое нарушение выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутрипеченочного холестаза при беременности, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, атрезии желчных протоков, холелитиаза, инфекционного холангита, холангита, ассоциированного с гистиоцитозом из клеток Лангерганса, синдрома Алажилля, внесиндромной недостаточности протоков, индуцируемого лекарственными средствами холестаза и ассоциированного с полным парентеральным питанием холестаза.

8. Соединение для применения по п.7, где холестатическое нарушение представляет собой PBC.

9. Соединение для применения по любому из п.п.1-8, для применения в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством с известной противофиброзной активностью, выбранным из пирфенидона или ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого противофиброзного соединения, связанного с препятствованием активируемым TGF β и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III), или компоненты SMAD-зависимого канонического каскада,

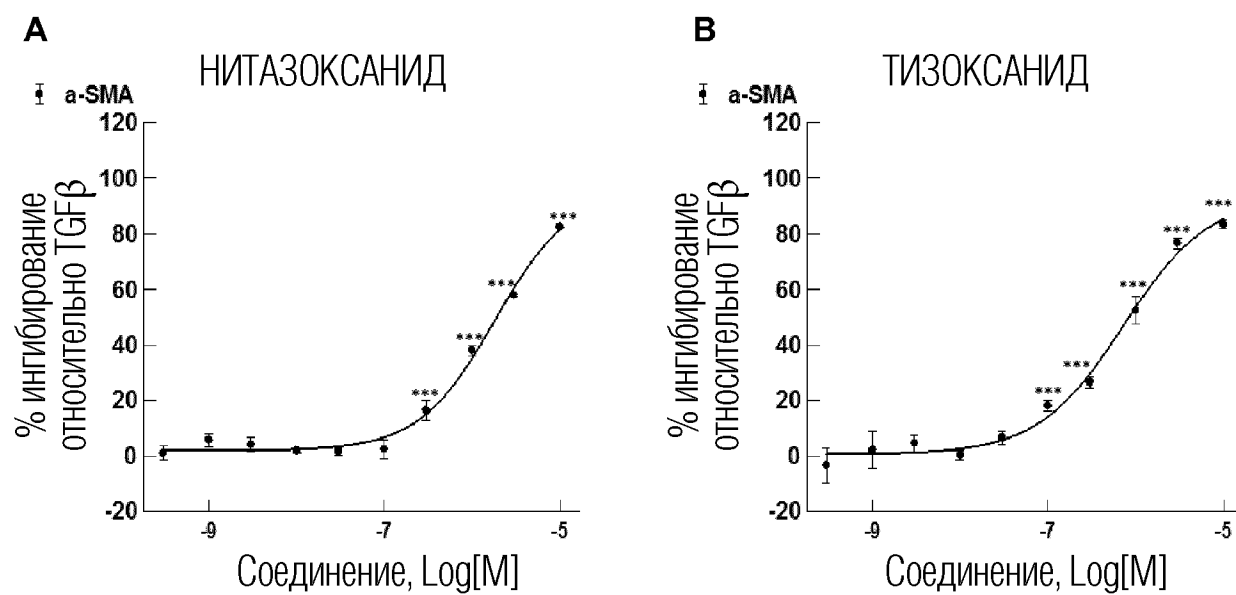
включающего регуляторные или ингибиторные белки SMAD, или представители независимых от SMAD или неканонических каскадов, включая различные ветви передачи сигнала MAPK, TAK1, каскады передачи сигнала Rho-подобной GTP-азой, каскады фосфатидилинозитол-3 киназы/АКТ, TGF β -индуцируемый процесс EMT или канонические и неканонические каскады передачи сигнала Hedgehog, включающие лиганды Nn или гены-мишени, или любые представители каскадов WNT или Notch, которые подвержены влиянию передачи сигнала TGF β .

10. Соединение для применения по любому из п.п.1-8, для применения в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством, выбранным из ингибиторов JAK/STAT, других противовоспалительных средств и/или иммунодепрессантов.

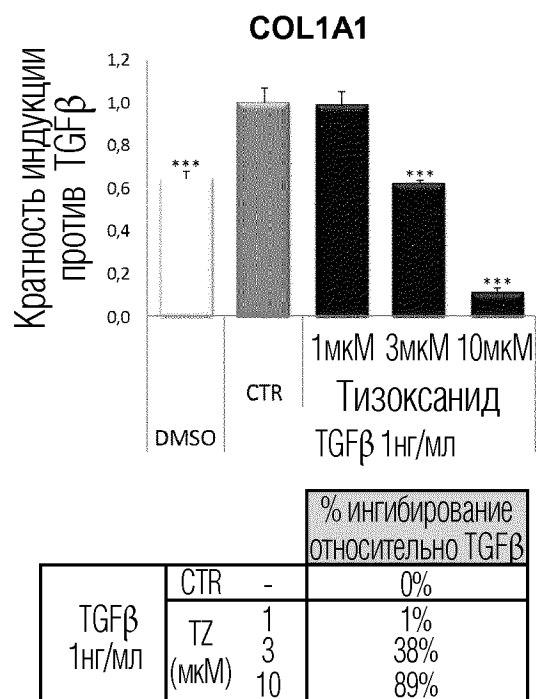
11. Соединение для применения по п.10, где терапевтически активное средство выбрано из глюкокортикоидов, NSAID, циклофосамида, нитрозомочевины, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пуринов, аналогов пиримидинов, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов рецепторов сфингозин-1-фосфата, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины рецепторы провоспалительных цитокинов, Т-клеточный рецептор, интегрины.

По доверенности

ФИГ. 1

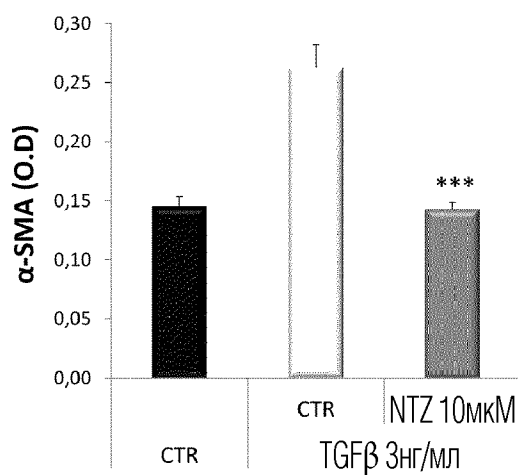


ФИГ. 2

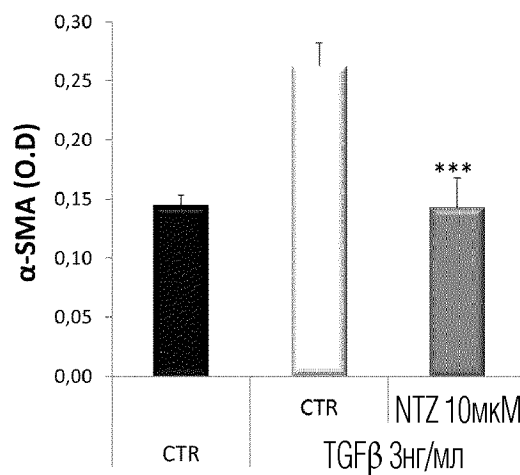


ФИГ. 3

A

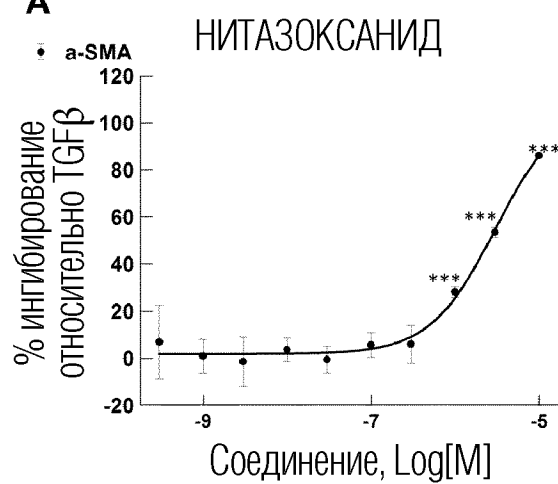


B

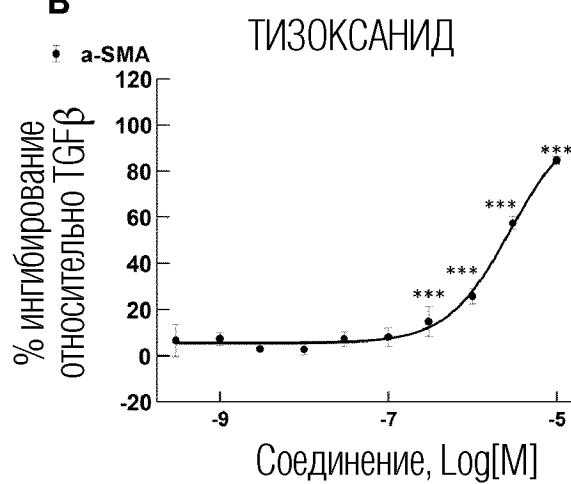


ФИГ. 4

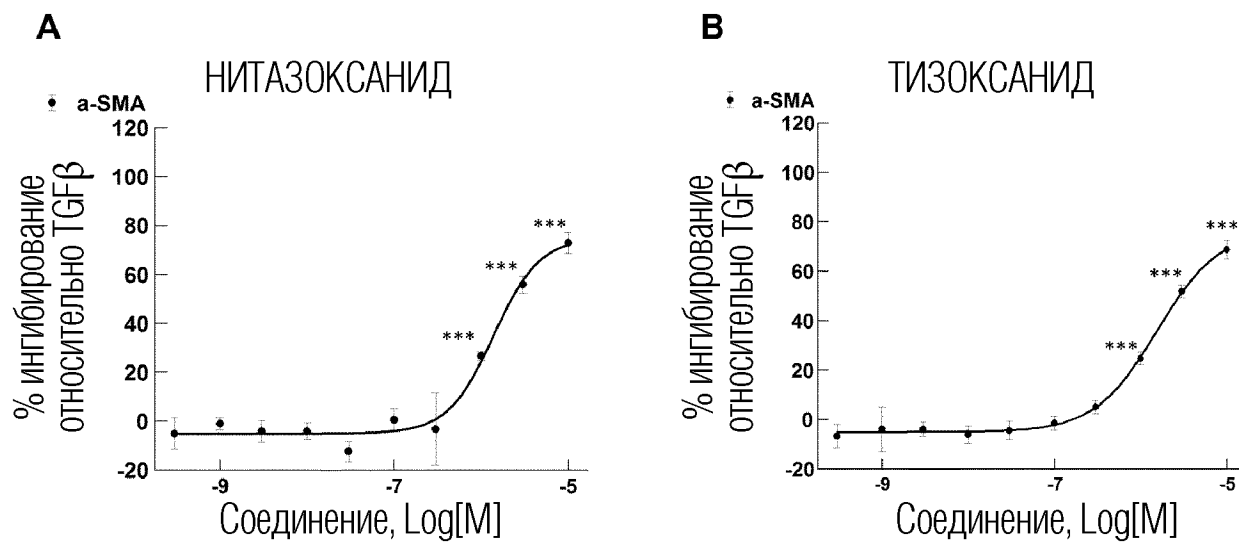
A



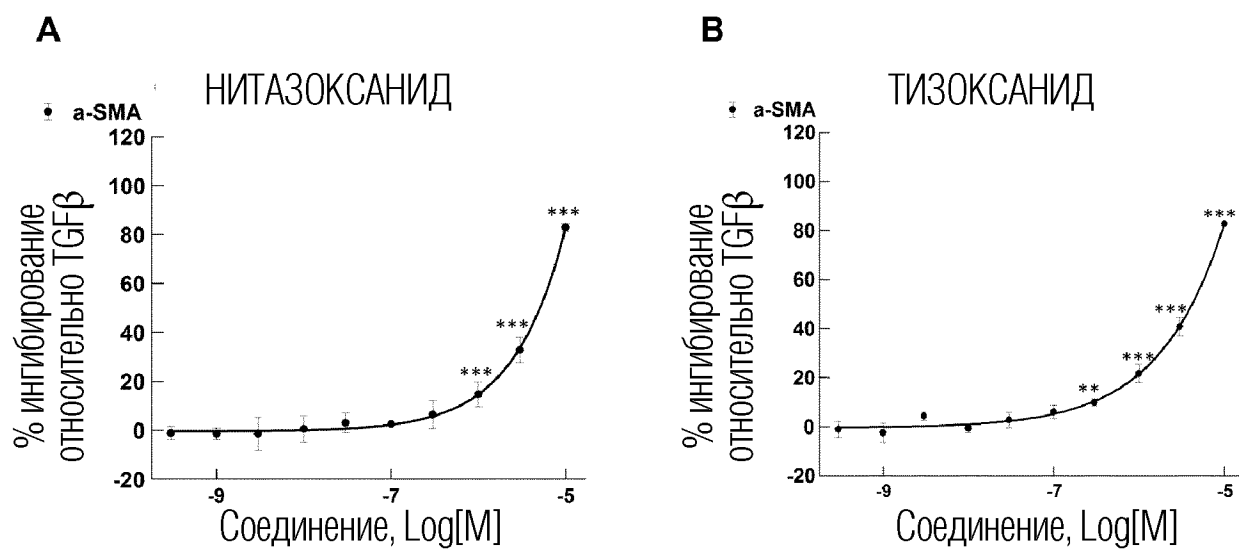
B



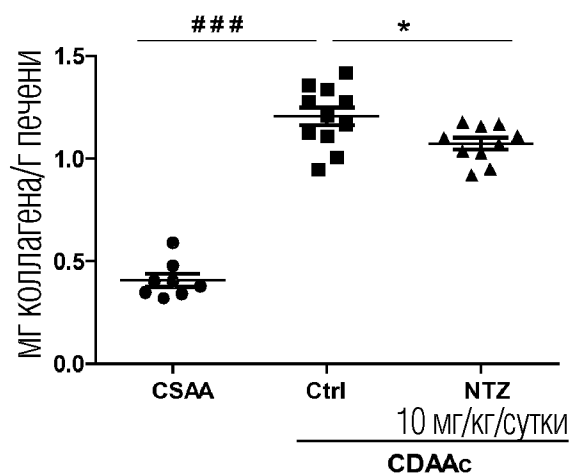
ФИГ. 5



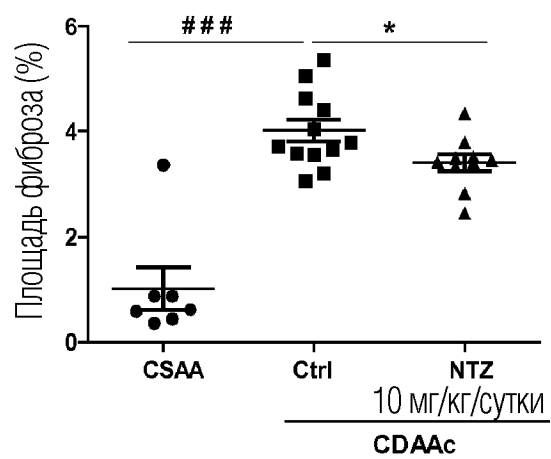
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

