

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043787**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.23**

**(21)** Номер заявки  
**201892297**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.03.13**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/22* (2006.01)  
*A61K 31/366* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 31/40* (2006.01)  
*A61K 31/405* (2006.01)  
*A61K 31/426* (2006.01)  
*A61K 31/47* (2006.01)  
*A61K 31/505* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01)

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАЦИИ НИТАЗОКСАНИДА ИЛИ ТИЗОКСАНИДА  
СО СТАТИНОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХОЛЕСТАТИЧЕСКИХ И ФИБРОТИЧЕСКИХ  
НАРУШЕНИЙ**

---

**(31)** 16305427.3

**(32)** 2016.04.11

**(33)** EP

**(43)** 2019.07.31

**(86)** PCT/EP2017/055880

**(87)** WO 2017/178173 2017.10.19

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЖЕНФИТ (FR)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вальчак Роберт, Фукар Коринн,  
Делатай Филипп (FR)**

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

**(56)** WO-A2-2013082469  
WO-A1-2008040967  
US-A1-2016008320

KORBA ET AL.: "Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 77, № 1, 1 January 2008 (2008-01-01), p. 56-63, XP022405848, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2007.08.005, discussion

---

**(57)** Изобретение относится к применению синергической комбинации (i) нитазоксанида (NTZ), дейтерированного производного NTZ (NTZ-D), тизоксанида (TZ) или тизоксанида глюкуронида (TZG) либо фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D, TZ или TZG; и (ii) по меньшей мере одного статина, выбранного из группы, состоящей из питевастатина, флувастатина, симвастатина, аторвастатина, ловастатина и правастатина, для лечения фибротического нарушения или холестатического нарушения, выбранного из первичного билиарного холангита (PBC) и первичного склерозирующего холангита. Комбинация соединения (i) со статином обеспечивает терапевтические эффекты при лечении многих типов холестатических и фиброзных заболеваний.

---

**B1**

**043787**

**043787**

**B1**

### Область техники

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

### 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 [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанол (нитазоксанид, NTZ), синтетическое антипротозойное средство, или его дейтерированные производные, или его активный метаболит 2-гидрокси-N-(5-нитро-2-тиазолил)бензамид (тизоксанид, известный как TZ) в комбинации со статинами демонстрируют синергическую противофиброзную активность. Более того, оценка NTZ в комбинации со статином в модели повреждения печени продемонстрировала его способность снижать концентрацию циркулирующих желчных кислот, таким образом отражая синергический потенциал этой комбинации в отношении лечения как холестатических (таких как PBC и PSC), так и фибротических заболеваний.

Было показано, что NTZ, впервые описанный в 1975 г. (Rossignol and Cavier, 1975), является высокоэффективным против анаэробных простейших, гельминтов и широкого спектра микробов, включая как анаэробные, так и аэробные бактерии (Rossignol & Maisonneuve, 1984; Dubreuil, Houcke et al., 1996; Megraudd, 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 или антибактериальной активностью, и в последние годы в нескольких исследованиях было показано, что NTZ также может проявлять противовирусную активность (Di Santo & Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). NTZ препятствует репликации вирусов различными путями, включая блокаду созревания белков гемагглютинаина (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 & Ehrisman, 2014).

Статины (ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редукасты) часто назначают в качестве лекарственных средств для лечения гиперхолестеринемии и для предупреждения сердечно-сосудистого заболевания.

В настоящее время существует 7 уникальных назначаемых статинов, которые включают правастатин, симвастатин и ловастатин (которые имеют природное происхождение в результате ферментации грибов) и вторую группу химически синтезированных статинов, состоящую из флувастатина, аторвастатина, розувастатина и питавастатина. Хотя все статины содержат часть дигидрокси-гептановой кислоты, подобную HMG-CoA, которая конкурирует за связывание с HMG-CoA редуктазой, каждый статин является уникальным и демонстрирует значительные различия в химической структуре, эффективности (например, IC<sub>50</sub> для ингибирования HMG-CoA-редуктазы), проникновении и удержании в тканях, времени полужизни, метаболизме и выведении, взаимодействиях лекарственное средство-лекарственное средство и безопасности. Механизмы, вовлеченные в благоприятные эффекты статинов в отношении предупреждения сердечно-сосудистых заболеваний по большей части связаны со способностью этих средств ингибировать биосинтез холестерина. Вследствие того факта, что 60-70% сывороточного холестерина образуются в результате биосинтеза в печени и HMG-CoA-редуктаза является ключевым скоростью-лимитирующим ферментом в каскаде биосинтеза холестерина, не является неожиданным, что ингибирование этого фермента приводит к значительному снижению уровней LDL-холестерина в кровотоке. Более того, снижение уровня LDL-холестерина приводит к активации рецепторов LDL печени и повышению выведения LDL. Как клинические, так и экспериментальные данные указывают на то, что суммарная польза терапии статинов может далеко выходить за пределы благоприятных эффектов на уровни холестерина в сыворотке. Эти независимые от холестерина эффекты, описанные как плейотропные эффекты

статинов, связаны со сниженным образованием изопреноидов. Действительно ингибирование HMG-CoA-редуктазы приводит не только к истощению внутриклеточного мевалоната, но также нескольких последующих производных изопреноидов, включая фарнезилпирофосфат (FPP) и геранилгеранилпирофосфат (GGPP). Как FPP, так и GGPP требуются для посттрансляционного пренилирования ряда белков (приблизительно 2% от всех клеточных белков (Wang, Liu et al., 2008)). Изопренилирование белков обеспечивает надлежащую субклеточную локализацию и транспорт внутриклеточных молекул. Например, неизопренилированные GTP-азы остаются цитозольными, в то время как изопренилированные GTP-азы имеют связанные липиды FPP или GGPP, которые позволяют встраивание и закоривание на клеточной мембране, а затем участвуют в передаче сигнала. Таким образом, ингибирование изопренилирования приводит к инактивации малых GTP-аз (ex Rho, Ras, Rac и Cdc42), которые необходимы во многих клеточных событиях (внутриклеточная передача сигнала, клеточная пролиферация, воспаление, подвижность (для обзора см. (McFarlane, Muniyappa et al., 2002; Zhou and Liao, 2009; Yeganeh, Wiehch et al., 2014; Kavalipati, Shah et al., 2015))). Поскольку было продемонстрировано, что GTP-аза Rho и ее белок-мишень Rock вовлечены в активацию/дифференцировку фибробластов в миофибробласты (Ji, Tang et al., 2014), ключевое событие в процессе фиброза, было проведено несколько исследований статинов для оценки их противомышечных свойств в различных патологических моделях. Было показано, что симвастатин снижает экспрессию маркеров фиброза в HSC как человека, так и крысы и имеет противомышечные свойства в различных моделях фиброза на животных (Rombouts, Kisanga et al., 2003; Watts, Sampson et al., 2005; Wang, Zhao et al., 2013; Marrone, Maeso-Diaz et al., 2015). Кроме того, питавастатин (Miyaki, Nojiri et al., 2011) и флувастатин (Chong, Hsu et al., 2015) были способны снижать фиброз в модели индуцированного рационом с CDAA NAFLD/NASH. Эти благоприятные эффекты статинов не ограничиваются фиброзом печени. Действительно было продемонстрировано, что аторвастатин был в значительной степени эффективным против индуцированного блеомицином фиброза легких (Zhu, Ma et al., 2013), в то время как было показано, что симвастатин ингибирует экспрессию маркеров фиброза в фибробластах, происходящих из фиброзного легкого человека (Watts, Sampson et al., 2005).

В рамках настоящего изобретения с использованием фенотипического скринингового анализа для идентификации потенциальных противомышечных средств было обнаружено, что NTZ, или его дейтерированные производные, или его активный метаболит TZ, в комбинации со статином препятствуют аддитивным или синергическим образом активации миофибробластов. Этот эффект был полностью неожиданным ввиду свойств, ранее описываемых для этих молекул. Комбинация NTZ, или его дейтерированных производных, или TZ с конкретным статином, по-видимому, является эффективной терапевтической стратегией против различных типов фибротических заболеваний. Более того, оценка NTZ или его производных в комбинации с конкретным статином продемонстрировала неожиданную синергическую способность снижать концентрацию желчных кислот в крови, таким образом отражая ее потенциал к лечению как холестатических заболеваний (таких как PBC и PSC), так и фибротических заболеваний.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к применению синергической комбинации, содержащей

(i) [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанойл (NTZ), дейтерированное производное NTZ (NTZ-D), 2-гидрокси-N-(5-нитро-2-тиазолил)бензамид (TZ) или тизоксанида глюкуроид (TZG) либо фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D, TZ или TZG; и

(ii) по меньшей мере один статин, выбранный из группы состоящей из питавастатина, флувастатина, симвастатина, аторвастатина, ловастатина и правастатина для лечения фибротических нарушений.

Настоящее изобретение также включает применение синергической комбинации

(i) низатоксанида (NTZ), дейтерированного производного NTZ (NTZ-D), тизоксанида (TZ) или тизоксанида глюкуроид (TZG) либо фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D, TZ или TZG; и

(ii) по меньшей мере одного статина, выбранного из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина, симвастатина, аторвастатина, ловастатина и правастатина,

для лечения холестатического нарушения, выбранного из первичного билиарного холангита (PBC) и первичного склерозирующего холангита.

Комбинация согласно изобретению может быть в форме фармацевтической композиции или набора.

Предпочтительно статин выбран из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина и симвастатина.

Комбинация дополнительно может содержать по меньшей мере одно терапевтически активное средство с известной противомышечной активностью, выбранное из пирфенидона или ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (RTK), таких как нинтеданиб, сорафениб и другие RTK, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого противомышечного соединения, связанного с препятствованием активируемым TGFβ и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGFβ, такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGFβ типа I (TGFBR1) или типа II (TGFBR2) и их лиганды, такие как TGFβ, 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 $\beta$ -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 $\beta$ .

Предпочтительно комбинация согласно изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одно терапевтически активное средство, выбранное из ингибиторов JAK/STAT и других противовоспалительных средств и/или иммунодепрессантов.

Терапевтически активное средство, которое применяется в настоящем изобретении, может быть выбрано из глюкокортикоидов, NSAID, циклофосамида, нитрозомочевины, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, финголимода и других модуляторов рецепторов сфингозин-1-фосфата, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, T-клеточный рецептор и интегрин.

При этом фибротическое нарушение выбрано из группы, 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.

В частности, фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза легких, идиопатического фиброза легких, фиброза кожи, фиброза глаз, эндомикардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, забрюшинного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза легких после хронического воспалительного заболевания дыхательных путей, такого как COPD, астма, эмфизема, легкое курильщика или туберкулез, алкогольного или индуцируемого лекарственными средствами фиброза печени, цирроза печени, индуцируемого инфекцией, фиброза печени, фиброза индуцируемого радиацией или химиотерапией, 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 внутривисцеральный холестаз 3 типа (PFIC3), перимплантационного фиброза и асбестоза.

#### Описание фигур

Сокращенные обозначения, использованные на фигурах и в тексте.

- $\alpha$ -SMA: альфа-гладкомышечный актин;
- ATORVA: аторвастатин;
- BDL: лигирование желчных протоков;
- BMP: морфогенетический белок костей;
- кДНК: комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;
- COL1A1: коллаген 1 типа, альфа 1;
- CDAА: дефицит холина, определяемый L-аминокислотами;
- CDAАс: рацион с дефицитом холина, определяемым L-аминокислотами, дополненный холестерином;
- CHOL: холестерин;
- CSAA: рацион, определяемый L-аминокислотами, дополненный холином;
- DDC: 3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидроколлиндин;
- DMSO: диметилсульфоксид;
- DTT: дитиотреитол;
- ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ;
- EMT: эпителиально-мезенхимальный переход;
- EOB: приращение по Блисссу;
- FBS: эмбриональная телячья сыворотка;
- FDA: управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств;
- FLUVA: флувастатин;
- FPP: фарнезилпирофосфат;
- GDF: факторы роста и дифференцировки;
- Hh: Hedgehog;
- GGPP: геранилгеранилпирофосфат;
- HMG-CoA: 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А;
- hHSC: звездчатые клетки печени человека;
- HSC: звездчатые клетки печени;

$IC_{50}$ : полумаксимальная ингибиторная концентрация;  
 ИМ $\mu$ оFib: кишечные миофибробласты;  
 MMP2: матриксная металлопептидаза 2;  
 MMP9: матриксная металлопептидаза 9;  
 мкл: микролитры;  
 LDL: липопротеин низкой плотности;  
 LOVA: ловастатин;  
 NHLF: нормальные фибробласты легкого человека;  
 NTZ: нитазоксанид;  
 PBC: первичный билиарный холангит;  
 PBS: фосфатно-солевой буфер;  
 PITA: питавастатин;  
 PSC: первичный склерозирующий холангит;  
 кПЦР: количественная полимеразная цепная реакция;  
 пМоль: пикомоль;  
 PRAVA: правастатин;  
 rhFGF: рекомбинантный основной фибробластный фактор роста человека;  
 ROSU: розувастатин;  
 РНК: рибонуклеиновая кислота;  
 RT: обратная транскриптаза;  
 SIMVA: симвастатин;  
 SmBM: базальная среда гладкомышечных клеток;  
 SteCGS: добавка для роста звездчатых клеток;  
 STeCM: среда для звездчатых клеток;  
 TBA: общий уровень желчных кислот;  
 TGF $\beta$ 1: фактор роста опухоли бета 1;  
 TGFBR1: рецептор TGF $\beta$  типа I;  
 TGFBR2: рецептор TGF $\beta$  типа II;  
 THBS1: тромбоспондин 1;  
 TMB: тетраметилбензидин;  
 TZ: тизоксанид;  
 TZG: тизоксанида глюкуронид.

На фиг. 1 показаны нитазоксанид и его метаболит тизоксанид, ингибирующие индуцируемую TGF $\beta$ 1 экспрессию белка  $\alpha$ -SMA в HSC человека.

Лишенные сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с NTZ (A) или TZ (B), а затем проводили активацию профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). После инкубации в течение 48 ч экспрессию  $\alpha$ -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1 1 нг/мл)]. Аппроксимацию кривой и вычисление полумаксимальной ингибиторной концентрации ( $IC_{50}$ ) проводили с использованием программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

На фиг. 2 показан дифференциальный противофиброзный эффект лекарственных средств-статинов в индуцированных TGF $\beta$  hHSC.

Лишенные сыворотки hHSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с питавастатином (A), флувастатином (B), симвастатином (C), аторвастатином (D), ловастатином (E), розувастатином (F) и правастатином (G), а затем проводили активацию профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). После инкубации в течение 48 ч экспрессию  $\alpha$ -SMA количественно определяли посредством ELISA. Полученные величины переводили в процентное ингибирование относительно контроля с TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1 3 нг/мл)]. Аппроксимацию кривой и вычисление полумаксимальной ингибиторной концентрации ( $IC_{50}$ ) проводили с использованием программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

На фиг. 3 показана комбинация NTZ и питавастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$  hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блисссу (EOB). Получали серии разведений NTZ (столбец) и питавастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (A) Процент

ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинированных пар. Данные представлены в качестве среднего значения для четырех повторений. (B) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). (C) Величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 4 показана комбинация NTZ и симвастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$ 1 hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блисссу (ЕОВ). Получали серии разведений NTZ (столбец) и симвастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинаций. (B) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). (C) Величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 5 показана комбинация NTZ и флувастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$ 1 hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блисссу (ЕОВ). Получали серии разведений NTZ (столбец) и флувастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинаций. (B) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). (C) Величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 6 показана комбинация NTZ и ловастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$ 1 hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блисссу (ЕОВ). Получали серии разведений NTZ (столбец) и ловастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинаций. (B) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). Пример синергической пары проиллюстрирован на (C), где величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 7 показана комбинация NTZ и аторвастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$ 1 hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блисссу (ЕОВ). Получали серии разведений NTZ (столбец) и аторвастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинаций. (B) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными

значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). (С) Величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 8 показана комбинация NTZ и правастатина, синергично ингибирующая  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$ 1 hHSC.

Комбинации исследовали в формате матрицы доза-эффект и анализировали в соответствии с моделью аддитивности приращения по Блиссу (ЕОВ). Получали серии разведений NTZ (столбец) и правастатина (ряд), включая их соответствующие контроли в виде DMSO. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1 (1 нг/мл). (А) Процент ингибирования  $\alpha$ -SMA относительно контроля в виде TGF $\beta$ 1 для всех комбинаций. (В) Показатели ЕОВ вычисляли, как описано в разделе "Материалы и способы". Любая пара соединений с положительными значениями ЕОВ считалась синергической (цвет от светло-серого до черного). (С) Величины данных, полученные для синергической комбинированной пары, наносили на график в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в качестве среднего значения (для четырех повторений)  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ комбинации одного средства и продукта проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

На фиг. 9 показан флувастатин, также обладающий синергическим эффектом с тизоксанидом, метаболитом NTZ, снижающий фиброз в индуцированных TGF $\beta$  hHSC.

Лишенные сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с субоптимальными дозами тизоксанида (TZ), флувастатина или комбинацией обоих продуктов. Данные представлены в качестве среднего значения для четырех повторений. Статистический анализ проводили посредством одностороннего ANOVA с последующим апостериорным критерием Бонферрони с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 (сравнение против группы "комбинации продуктов")].

На фиг. 10 показана комбинация NTZ с симвастатином, синергично препятствующая индуцируемым СС14 уровням концентрации ТВА в крови.

Крысам массой 250-275 внутрибрюшинно инъецировали оливковое масло (контрольная группа) или СС14, эмульгированный в оливковом масле (СС14:оливковое масло 1:2 об./об., конечная концентрация СС14: 2 мг/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 СС14, начинали давать контрольный рацион или рацион, дополненный NTZ 30 мг/кг/сутки, SIMVA 10 мг/кг/сутки или комбинацией NTZ 30 мг/кг/сутки/SIMVA 10 мг/кг/сутки. После умерщвления определяли концентрацию циркулирующего ТВА. Данные представлены в качестве среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0: оливковое масло против СС14: критерий суммы рангов Манна-Уитни: ###: p<0,001; СС14 против СС14+ обработка соединением: критерий Крускала-Уоллиса, а затем апостериорный критерий Данна \*\*\* p<0,001; комбинация NTZ/SIMVA против NTZ 30 мг/кг или SIMVA 10 мг/кг: критерий суммы рангов Манна-Уитни: \$\$\$ p<0,001.

#### **Подробное описание изобретения**

В экспериментальной части настоящей заявки показано, что комбинация (i) NTZ или TZ с (ii) статином может синергично обеспечивать противоишемические свойства в активированных миофибробластах. Более того, показано, что комбинация (i) NTZ или TZ с (ii) статином также может снизить измененные уровни общих желчных кислот в модели повреждения печени. Таким образом, настоящее изобретение относится к новой синергической комбинации активных веществ, содержащей (i) NTZ или производное NTZ, такое как дейтерированное производное NTZ (NTZ-D), TZ или TZG, или фармацевтически приемлемую соль NTZ, NTZ-D, TZ или TZG и (ii) статин.

В частности, настоящее изобретение относится к синергической комбинации (i) NTZ, дейтерированного производного NTZ, или TZ, или фармацевтически приемлемой соли NTZ, TZ или дейтерированного производного NTZ и (ii) статина для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения.

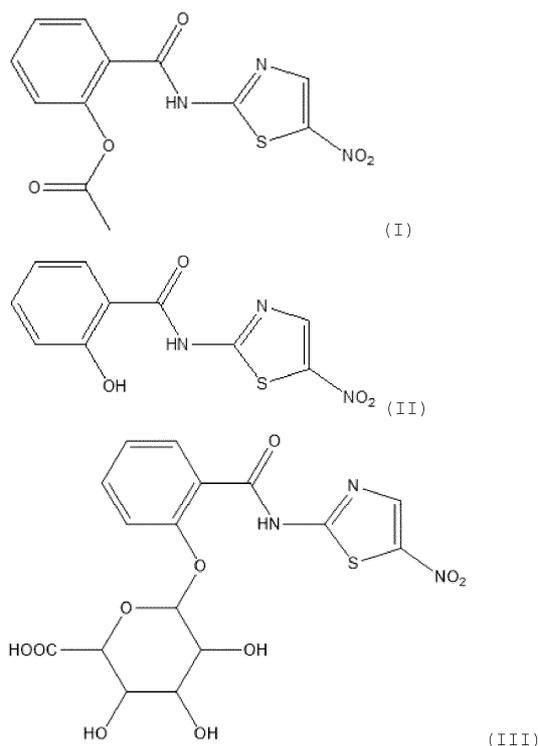
Более того, изобретение относится к применению синергической комбинации по изобретению, содержащей (i) NTZ, NTZ-D, TZ или TZG либо фармацевтически приемлемую соль NTZ, NTZ-D, TZ или TZG и (ii) статин для производства лекарственного средства, пригодного для лечения холестатического и фибротического нарушения. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей (i) NTZ, NTZ-D, TZ или TZG либо фармацевтически приемлемую соль NTZ, NTZ-D, TZ или TZG и (ii) статин, причем указанные компоненты (i) и (ii) действуют синергично, как описано в настоящем описании. Фармацевтическая композиция по изобретению пригодна для лечения холестатического или фиб-

ротического нарушения.

Хотя этиологические факторы или иницирующие события фибротических нарушений являются довольно разнообразными и их патогенез варьируется, общим признаком пораженных тканей является присутствие больших количеств активированных фибробластов, называемых миофибробластами ((Rosenthal, Mendoza et al., 2013)). Стимул фиброза, такой как TGF $\beta$ 1, может индуцировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты (Leask and Abraham, 2004; Leask, 2007). Миофибробласты представляют собой метаболически и морфологически отличимые фибробласты, активация которых играет ключевую роль в фибротическом ответе. Более того, эти миофибробласты проявляют уникальные биологические функции, включая экспрессию белков, вовлеченных в образование внеклеточного матрикса, таких как различные формы коллагена. Индукция экспрессии  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -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  $\beta$  и особенно фактор роста опухоли бета 1 (TGF $\beta$ 1) являются общепризнанными физиологическими сигналами, которые индуцируют фенотипическую трансформацию фибробластов в профибротические миофибробласты, которые экспрессируют высокие уровни  $\alpha$ -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 и дейтерированные производные NTZ продемонстрировали противofiброзные свойства, поскольку эти соединения дозозависимым образом снижали уровень  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$  звездчатых клетках печени и в первичных фибробластах из других органов. Более того, NTZ и его метаболит TZ продемонстрировали антихолестатические свойства вследствие их способности снижать общий уровень желчных кислот в крови в модели повреждения печени. NTZ, TZ и TZG для применения в рамках изобретения имеют следующие формулы (I), (II) и (III) соответственно:

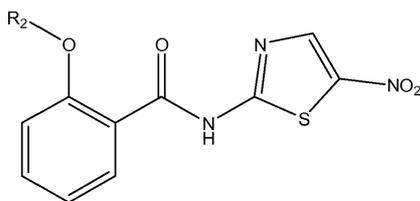


NTZ и TZ(G) ("TZ(G)", обозначаемый как "TZ или TZG") известны вследствие их противопаразитарной и противовирусной активности, однако в документах уровня техники не описано, что NTZ и TZ (G) обладают антихолестатическим и противofiброзным эффектом.

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

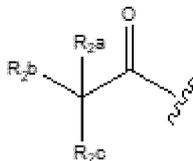
В документах уровня техники не описано, что дейтерированные производные NTZ (также обозначаемые в настоящей заявке как "NTZ-D") обладают антихолестатическими или противofiброзными эффектами.

В соответствии с настоящим изобретением, дейтерированные производные NTZ, используемые в композиции по изобретению, имеют следующую формулу (IV):



(IV)

где R<sub>2</sub> обозначает группу



где R<sub>2a</sub>, R<sub>2b</sub> и R<sub>2c</sub>, идентичные или различные, обозначают атом водорода или атом дейтерия при условии, что R<sub>2a</sub>, R<sub>2b</sub>, R<sub>2c</sub> не являются одновременно атомами водорода.

В конкретном варианте осуществления R<sub>2a</sub>, R<sub>2b</sub> и R<sub>2c</sub> обозначают атом дейтерия.

В конкретном варианте осуществления R<sub>2a</sub> и R<sub>2b</sub> обозначают атом дейтерия, R<sub>2c</sub> обозначает атом водорода.

В конкретном варианте осуществления R<sub>2a</sub> обозначает атом дейтерия, R<sub>2b</sub> и R<sub>2c</sub> обозначают атом дейтерия.

Примеры таких соединений по изобретению включают

соединение 1: 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил] фенил (d3) этаноат;

соединение 2: 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноат; и

соединение 3: 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1)этанат.

В контексте настоящего изобретения "NTZ, NTZ-D и TZ (G), фармацевтически приемлемые соли NTZ, NTZ-D и TZ(G)" или "соединение формулы (I), (II), (III) и (IV) и фармацевтически приемлемые соли соединения формулы (I), (II), (III) и (IV)" в совокупности называют "компонентом (i)" или "компонентом (i) комбинации".

В контексте настоящего изобретения "компонент (ii)" или "компонент (ii) комбинации" относится к "по меньшей мере одному статину" или "статину".

Авторы изобретения также продемонстрировали новым и изобретательским путем, что комбинация NTZ, NTZ-D, TZ(G) со статином может иметь синергический антихолестатический и/или противофиброзный эффект в HSC человека.

В рамках настоящего изобретения синергию определяют как координированное или коррелирующее действие двух или более структур, так что комбинированное действие превышает сумму каждого отдельного действия.

Таким образом, изобретение относится к синергической комбинации (i) NTZ, NTZ-D, TZG или фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D или TZ(G) со (ii) статином. Кроме того, изобретение относится к этой комбинации для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения комбинация содержит (i) NTZ, NTZ-D или TZ либо фармацевтически приемлемую соль NTZE, NTZ-D или TZ и (ii) статин.

В следующем аспекте изобретение относится к синергической комбинации по изобретению для применения для ингибирования пролиферации и/или активации фибробластов. Как известно в данной области, фибробласты ответственны за продукцию коллагеновых волокон или других компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани.

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 тканью в ответ на повреждение ткани. Физиологическое 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 забрюшинного пространства), костного мозга, суставов, глаз и желудка, в частности, фиброз печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нерв-

ной 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 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 внутripеченочные 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 подвергнутое 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 пневмокозиоза 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 внутripеченочный холестаз 3 типа (PFIC3), перимплантационный фиброз и асбестоз.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения, холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутripеченочного холестаза при беременности, прогрессирующего семейного внутripеченочного 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 комбинации по изобретению 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 комбинации по настоящему изобретению, например, в форме фармацевтической композиции, содержащей компоненты (i) и (ii) комбинации, 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, подвергнутом лечению, является млекопитающее, предпочтительно человек. Индивидуум, подвергнутый 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.

В соответствии с настоящим изобретением, термин "статин(ы)" относится к ингибиторам HMG-CoA-редуктазы, которые представляют собой класс снижающих уровень холестерина лекарственных средств, которые ингибируют фермент HMG-CoA-редуктазу, играющий центральную роль в продукции холестерина. Повышенные уровни холестерина в крови ассоциируют с сердечно-сосудистым заболеванием (CVD), и во многих исследованиях было показано, что риск явлений CVD может быть снижен по-

средством терапии, снижающей уровень липидов. В начале средства, снижающие уровень липидов, были ограничены по существу рационом с низким содержанием насыщенных жиров и холестерина, средствами, усиливающими секрецию желчных кислот (холестирамин и колестипол), никотиновой кислотой (ниацин), фибратами и пробуколом. К сожалению, все эти способы лечения имеют ограниченную эффективность или переносимость либо и то, и другое.

Ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, описанные выше, принадлежат к структурному классу соединений, которые содержат часть, которая может существовать либо в качестве кольца 3-гидроксилактона, либо в качестве соответствующей дигидрокси-открытой кислоты с открытым кольцом. Соли дигидрокси-открытой кислоты могут быть получены и, в действительности, как отмечалось выше, несколько выпускаемых в продажу статинов вводят в качестве форм солей дигидрокси-открытых кислот.

Например, ловастатин и симвастатин выпускаются в продажу по всему миру в их лактонизированной форме.

Было обнаружено, что статины снижают вероятность сердечно-сосудистой заболеваемости и смертность у индивидуумов, имеющих высокий риск. Существуют убедительные доказательства того, что статины являются эффективными для лечения CVD на ранних стадиях заболевания (вторичная профилактика) и у индивидуумов, имеющих повышенный риск, но не имеют CVD (первичная профилактика).

Согласно изобретению термин "статин(ы)", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, флувастатин, аторвастатин, мевастатин, церивастатин, ловастатин, симвастатин, розувастатин, правастатин и питавастатин. Согласно конкретному варианту осуществления изобретения статин выбран из питавастатина, флувастатина, симвастатина и аторвастатина.

Статины могут иметь форму соли, гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла. Статины также могут иметь форму гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла соли. Статины также могут присутствовать в форме свободной кислоты или лактона в соответствии с настоящим изобретением.

Компонент (ii) комбинации может включать один или несколько статинов, т.е. один статин или смесь статинов.

Согласно изобретению, статин, содержащийся в комбинации по изобретению, выбирают так, чтобы комбинация указанного статина и компонента (i) комбинации по изобретению обеспечивала синергическое действие против холестерина или фиброза. Такая синергия может быть определена способами, хорошо известными в данной области, например, с использованием способа приращения по Блисссу (ЕОВ), описанного в примерах.

В предпочтительном варианте осуществления статин в синергической комбинации по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из ловастатина, розувастатина, правастатина, питавастатина, флувастатина, симвастатина и аторвастатина, в частности из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина и симвастатина.

Другой аспект изобретения относится к синергической комбинации, описанной выше, в форме фармацевтической композиции. Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей (i) NTZ, NTZ-D или TZ(G) либо фармацевтически приемлемую соль NTZ, NTZ-D или TZ(G) и (ii) статин.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к синергической комбинации, описанной выше, в форме набора для одновременного, последовательного или раздельного введения его компонентов, как более подробно описано ниже.

Изобретение также относится к способу лечения холестерина или фиброза.

Лечение вовлекает введение синергической комбинации по изобретению пациенту, имеющему указанное нарушение, для излечения, отсрочивания или замедления прогрессирования, таким образом улучшая состояния пациента, или здоровому индивидууму, в частности индивидууму, имеющему риск развития холестатического или фибротического заболевания, для профилактики заболевания.

Индивидуумы, подлежащие лечению согласно изобретению, могут быть выбраны в соответствии с несколькими критериями, ассоциированными с фибротическими заболеваниями, такими как предшествующее лечение лекарственными средствами, ассоциированные патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также любой другой имеющий значение биомаркер, который может быть оценен способами визуализации и иммунологическим, биохимическим, ферментативным, химическим способом или способом детектирования 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 лечения холестатического или фибротического нарушения может включать введение композиции, содержащей по меньшей мере два соединения, выбранных из NTZ, NTZ-D и TZ(G). В этом варианте осуществления введенный статин составляют в той же композиции, что и эти два соединения, или в отдельной форме, например в другой композиции.

В другом варианте осуществления синергическая комбинация по изобретению предназначена для

одновременного, последовательного или раздельного введения при терапии, таким образом, она может содержаться в различных композициях. В случае последовательного введения, компонент (i) комбинации можно вводить до компонента (ii) или компонент (ii) вводят до компонента (i). По существу изобретение также относится к наборам, содержащим синергическую комбинацию

- (i) NTZ, NTZ-D и TZ (G) или фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D и TZ (G); и
- (ii) статина, для одновременного, последовательного или раздельного введения.

NTZ, NTZ-D, TZ(G) и статин можно составлять в качестве фармацевтически приемлемых солей, в частности кислых или основных солей, совместимых с фармацевтическим применением. Соли NTZ, NTZ-D, TZ(G) и статина 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.

Комбинации компонентов (i) и (ii), в частности соединения формулы (I), (II), (III) или (IV), с одним или несколькими статином(ами) можно составлять в качестве фармацевтически приемлемых нетоксичных солей, получаемых из органических или неорганических оснований или кислот соединения формулы (I), (II), (III) (IV) или статина(ов). Эти соли можно получать на последней стадии очистки соединения или путем включения соли в ранее очищенное соединение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие компонент (i) и/или (ii), в частности, содержащие соединение формулы (I), (II), (III) и/или один или несколько статин(ов), также могут содержать один или несколько эксципиентов или носителей, приемлемых в фармацевтическом контексте (например, солевые растворы, физиологические растворы, изотонические растворы и т.д., совместимые с фармацевтическим применением и хорошо известные специалисту в данной области).

Эти композиции 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, 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 состава этого типа предпочтительно можно использовать такие средства, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие компонент (i) и/или (ii) состава, такие как соединение формулы (I), (II), (III) и/или один или несколько статин(ов) (статин выбран, как упоминалось выше, из статинов, которые обеспечивают синергический эффект с компонентом (i) комбинации по настоящему изобретению) можно вводить различными путями и в различных формах. Например, соединение(я) можно вводить системным путем, перорально, парентерально, ингаляционным путем, посредством назального спрея, 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 компонента (i) в комбинации с одним или несколькими статином(ами) по методикам, хорошо известным специалистам в данной области.

В конкретном варианте осуществления компонент(ы) (i) и (ii) составляют в качестве таблетки или таблеток. В другом конкретном варианте осуществления соединения вводят перорально.

NTZ, NTZ-D или TZ(G) в комбинации с одним или несколькими статином(ами) вводят в терапевтически эффективном количестве. В контексте изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, достаточному для обеспечения желаемого терапевтического результата.

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, комбинацию (например, в форме фармацевтической композиции или набора) по настоящему изобретению можно вводить для лечения холестатического или фибротического заболевания в дозе компонента (i) комбинации, составляющей от 0,01 до 4000 мг/сутки, как например от 50 до 2000 мг/сутки, такой как от 100 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-

но 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.

Доза статина в указанной комбинации может варьироваться в зависимости от самого статина. Доза адаптирована к эффективности статина в соответствии с типичным режимом для статина.

Например, для флувастатина доза может составлять от 10 до 50 мг/сутки и, в частности, от 20 до 40 мг/сутки.

Для питавастатина доза может составлять от 0,1 мг/сутки до 6 мг/сутки и, в частности, от 1 до 4 мг/сутки.

Как для симвастатина, так и для аторвастатина, доза может составлять от 1 до 100 мг/сутки и, в частности, от 10 до 80 мг/сутки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения компонент (i), в частности NTZ, используют в комбинации с флувастатином в дозе, составляющей от 100 до 1000 мг/сутки для NTZ и от 1 до 4 мг/сутки для флувастатина.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения компонент (i), в частности NTZ, используют в комбинации с питавастатином в дозе, составляющей от 100 до 1000 мг/сутки для NTZ и от 1 до 4 мг/сутки для питавастатина.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения компонент (i), в частности NTZ, используют в комбинации с симвастатином или аторвастатином в дозе, составляющей от 100 до 1000 мг/сутки для NTZ и от 10 до 80 мг/сутки для симвастатина и аторвастатина.

В другом предпочтительном варианте осуществления активные ингредиенты вводят в качестве одной или нескольких фармацевтической композиции(ий) в форме пилюли или таблетки, предназначенной для перорального приема.

Введение при необходимости можно проводить каждые сутки или даже несколько раз в сутки.

В подходящем случае курс лечения комбинацией по изобретению 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 комбинации по изобретению, включающему, 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 комбинации по настоящему изобретению, дополнительно комбинированной по меньшей мере с одним другим терапевтически активным средством, таким как другие молекулы с известной противомышечной активностью. Эта дополнительная комбинация по настоящему изобретению пригодна для лечения холестатического или фибротического нарушения.

Согласно варианту этого варианта осуществления NTZ, TZ или дейтерированное производное NTZ в комбинации с одним или несколькими статином(ами) можно комбинировать с любым противомышечным 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 противомышечное соединение, связанное с препятствованием активируемым TGF $\beta$  и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF $\beta$ , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF $\beta$  типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF $\beta$ , 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 $\beta$ -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 $\beta$ .

Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, в частности, для применения в способе лечения холестатического или фибротического заболевания, содержащей соединение, выбранное из компонента (i) с компонентом (ii) в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным средством с известной противомышечной 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 противofиброзного соединения, связанного с препятствованием активируемым TGF $\beta$  и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGF $\beta$ , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF $\beta$  типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF $\beta$ , 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 $\beta$ -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 $\beta$ , для применения в способе лечения холестатического или фибротического нарушения.

В другом конкретном варианте осуществления другие классы молекул, которые можно комбинировать с компонентом (i) и компонентом (ii), 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, T-клеточный рецептор, интегрин. Другие классы молекул, которые также можно комбинировать с компонентом (i) и компонентом (ii), включают молекулы, которые потенциально могут усиливать экспозицию или эффект компонента (i) с компонентом (ii).

В другом варианте осуществления, компоненты (i) и (ii), вводят в качестве единственного активного ингредиента.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения холестатического или фибротического заболевания, включающим введение комбинации по настоящему изобретению, в частности, в форме фармацевтической композиции или набора, содержащих компонент (i) и компонент (ii).

Изобретение далее описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

### Примеры

Материалы и способы.

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Fluka, каталожный № 41640). Нитазоксанид (INTERCHIM, каталожный № RQ550U), тизоксанид (INTERCHIM, каталожный № RP253) получали из коммерческих источников, также как питавастатин (INTERCHIM каталожный № 15414), симвастатин (Sigma Aldrich, каталожный № S6196), флувастатин (Sigma Aldrich, каталожный № Y0001090), правастатин (Selleckchem, каталожный № S3036), розувастатин (Selleckchem, каталожный № S2169), ловастатин (Selleckchem, каталожный № S4223), аторвастатин (Sigma Aldrich, каталожный № PZ0001).

Культивирование hHSC.

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

Получение композиций.

Комбинационная матрица для 2 компонентов (NTZ/статин или TZ/статин).

Использовали матрицу типа шахматной доски. Исходные растворы NTZ или TZ и статина подвергали серийному разведению в DMSO сериями из 5 точек в рядах (статин) и столбцах (NTZ или TZ) 96-луночного планшета. В качестве 6-й точки использовали 100% DMSO без соединения. Затем получали комбинационную матрицу 6x6 путем смешения 1:1 всех концентраций отдельных средств. Выбирали пять исследуемых концентраций для каждого соединения, исходя из соответствующей IC<sub>50</sub> каждого соединения в качестве единственного средства, полученной путем количественного определения содержания  $\alpha$ -SMA в модели HSC, стимулированных TGF- $\beta$ 1. Затем выбирали концентрации в 2 и в 4 раза более высокие и более низкие.

Для правастатина и розувастатина, которые, как было обнаружено, являются неактивным и слабым ингибитором, соответственно, в модели стимулированных TGF- $\beta$ 1 HSC, диапазон дозировок выбирали произвольно (5 доз, подвергнутых 2-кратному серийному разведению, начиная с 4 мкМ).

Активация hHSC посредством TGF- $\beta$ 1 и обработка соединением.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Innopro) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем клетки высевали с плотностью  $2 \times 10^4$  клеток/луночка в 96-луночные планшеты для количественного определения  $\alpha$ -SMA посредством ELISA. Для обработки NTZ, статинами

(питавастатин, флувастатин, симвастатин, аторвастатин, ловастатин, розувастатин, правастатин) и соответствующими комбинациями NTZ/статинов, а также для обработки TZ, сатинами (питавастатин, симвастатин, флувастатин, правастатин) и соответствующими комбинациями TZ/статинов, лишенные сыворотки hHSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с соединениями, а затем добавляли профиброгенный стимул TGF- $\beta$ 1 (PeproTech, каталожный № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде в течение дополнительных 48 ч. В конце обработки клетки промывали PBS (Invitrogen, каталожный № 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.

ELISA для  $\alpha$ -SMA.

Уровень  $\alpha$ -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 1 ч, 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 ACTA2, Abnova) на 2 ч при комнатной температуре, а затем проводили 3 промывания. Для обнаружения сначала наносили конъюгированный с HRP стрептавидин (R&D Systems, каталожный № 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 точно измерение интенсивности при 450 нм с использованием спектрофотометра. Развившаяся окраска прямо пропорциональна количеству  $\alpha$ -SMA, присутствующего в лизате.

Определение синергии способом приращения по Блисссу (EOB).

Величины, полученные в анализе ELISA для  $\alpha$ SMA, сначала переводили в процентное ингибирование относительно контроля в виде TGF- $\beta$ 1. Затем с использованием этого процентного ингибирования, конвертированного в доли (процент, деленный на 100), определяли EOB (приращение по Блисссу) для определения синергических эффектов комбинаций лекарственных средств. Сначала определяли ожидаемый показатель аддитивности по Блисссу (E) с использованием уравнения

$$E=(A+B)-(A \times B),$$

где A и B представляют собой процентное ингибирование, конвертированное в доли в диапазоне от 0 до 1, для NTZ (A) и данного статина (B) в данной дозе.

Различие между ожидаемым значением по Блисссу и наблюдаемым ингибированием посредством комбинации NTZ/статинов в той же самой дозе представляет собой показатель "приращения по Блисссу".

Показатель приращения по Блисссу=0 указывает на то, что комбинированное лечение является аддитивным (что ожидается для эффектов в случае независимых путей);

показатель приращения по Блисссу>0 указывает на активность, превышающую аддитивную (синергия); и

показатель приращения по Блисссу<0 указывает на то, что комбинация является менее чем аддитивной (антагонизм).

Для каждой комбинации продуктов (NTZ+статинов) вычисляли дополнительный общий показатель по Блисссу путем суммирования всех EOB.

Для подтверждения синергии экспериментальные величины, соответствующие наибольшему показателю EOB для каждой комбинации NTZ/статинов, наносили на столбиковую диаграмму. Значимость наблюдаемых отличий между NTZ/статином или TZ/статином и отдельными средствами оценивали посредством t-критерия Стьюдента или критерия суммы рангов Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 [\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001].

Оценка синергического терапевтического эффекта комбинации NTZ /SIMVA при индуцированном CCl4 фиброзе печени.

Синергический эффект комбинации NTZ/SIMVA оценивали в модели индуцированного CCl4 повреждения печени на крысах.

Крысы OFA S;Dawley (исходная масса тела 250-275 г) случайным образом распределяли в соответствии с их массой тела в 5 групп 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 соединениями. Использовали 3 режима для воздействия NTZ 30 мг/кг/сутки, SIMVA 10 мг/кг/сутки или NTZ/SIMVA 30/10 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 синергического терапевтического эффекта комбинации NTZ/SIMVA в модели индуцируемого DDC холестаза.

Синергический эффект комбинации NTZ/SIMVA оценивают в модели индуцируемого DDC холестаза.

Мышей C57BL/6 кормят в течение 8 недель рационом, дополненным 0,1% DDC, или рационом, дополненным 0,1% DDC, соответствующим соответственно воздействию NTZ 100 мг/кг/сутки или SIMVA 10 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 синергического терапевтического эффекта комбинации NTZ/SIMVA в модели хронического индуцированного CCl<sub>4</sub> фиброза печени.

Мышам C57BL/6 в возрасте 9 недель дают контрольный рацион или рацион, дополненный NTZ, в течение 6 недель. Используют 8 режимов рационов, включающих NTZ и/или SIMVA, соответствующих соответственно воздействию NTZ 30 или 100 мг/кг/сутки или SIMVA 3 или 10 мг/кг/сутки, или комбинации NTZ/SIMVA 30/3; 100/3; 30/10; 100/10 мг/кг/сутки соответственно. Одновременно и на протяжении всех 6 недель мышам вводят 3 раза в неделю CCl<sub>4</sub>, растворенный в оливковом масле, или носитель, через пероральный зонд. Количество CCl<sub>4</sub> постепенно повышают от 0,875 до 2,5 мл/кг. В последний день введения мышей умерщвляют после периода голодания, длящегося 6 ч. Проводят взятие образцов крови и выделение сыворотки для биохимического анализа. Печень сразу извлекают для биохимических, гистологических исследований и исследований экспрессии.

Оценка синергического терапевтического эффекта комбинации NTZ/SIMVA в модели BDL.

Хирургическое лигирование желчных протоков проводят на крысах для индукции внепеченочного холестаза, а затем фиброза печени. После короткого периода восстановления животным вводят NTZ в дозе 30 или 100 мг/кг/сутки, SIMVA в дозе 3 или 10 мг/кг или комбинации NTZ/SIMVA 30/3 или 100/10 мг/кг/сутки в течение одной или двух недель. В последний день введения мышей умерщвляют после периода голодания, длящегося 6 ч. Образцы крови собирают и сыворотку выделяют для биохимического анализа. Печень сразу извлекают для биохимических, гистологических исследований и исследований экспрессии.

Количественное определение концентрации общих желчных кислот в плазме.

Концентрацию общих желчных кислот (ТБА) в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автоматического анализатора Daytona (Randox, каталожный № BI 3863). В присутствии тио-NAD, фермент 3- $\alpha$  гидроксистероиддегидрогеназа (3- $\alpha$  HSD) конвертирует желчные кислоты в 3-кетостероиды и тио-NADH. Реакция является обратимой и 3- $\alpha$  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 ( $\alpha$ -SMA), - положительные миофибробласты. В попытках найти новые противомышечные молекулы библиотеку одобренных FDA лекарственных средств подвергли фенотипическому скринингу в модели HSC человека, активированных профиброгенным цитокином TGF $\beta$ 1. Уровни  $\alpha$ -SMA, признак фибротических очагов, использовали для оценки эффективности препятствования лекарственными средствами фиброзного процесса. Скрининг привел к идентификации нитазоксанида (NTZ), который дозозависимым образом снижал уровень  $\alpha$ -SMA в индуцированных TGF $\beta$  HSC. В целом, NTZ проявлял IC<sub>50</sub> 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 противомышечной активности в HSC. TZ продемонстрировал профиль, сходный с исходным лекарственным средством, с IC<sub>50</sub> от 0,1 до 3 мкМ (фиг. 1B). Другие маркеры стимуляции TGF $\beta$  снижались обоими соединениями, включая коллаген 1A1 (COL1A1) внеклеточного матрикса (фиг. 2). Анализы токсичности подтвердили, что сниженные уровни  $\alpha$ -SMA не были следствием токсичности или апоптоза HSC (данные не представлены). Поскольку известно, что NTZ быстро гидролизует в его активный метаболит тизоксанид (TZ) (Broekhuysen, Stockis et al., 2000), этот метаболит также оценивали в отношении его противомышечной активности в HSC. TZ продемонстрировал профиль, сходный с исходным лекарственным средством, с IC<sub>50</sub>, составляющей от 0,1 до 3 мкМ (фиг. 1B). Интересно, что конкретные статины, но не все, также были идентифицированы в ходе скрининга. Анализ доза-эффект, проведенный в модели индуцированных TGF $\beta$  HSC (фиг. 2) продемонстрировал, что 7 исследованных статинов не являются эквивалентными в отношении их противомышечных свойств.

Как правило, питавастатин (фиг. 2A) и флувастатин (фиг. 2B), наиболее эффективные противомышечные статины, демонстрировали IC<sub>50</sub> ниже 1 мкМ, в то время как величины IC<sub>50</sub> для симвастатина

(фиг. 2C), аторвастатина (фиг. 2D), ловастатина (фиг. 2E), как правило, составляли от 1 до 3 мкМ. Розувастатин (фиг. 2F) продемонстрировал значительную противофиброзную активность, но только в наиболее высоких дозах, и было обнаружено, что правастатин (фиг. 2G) является неактивным в качестве единственного средства в исследованных дозах. Следует отметить, что противофиброзные свойства различных представителей семейства статинов, по-видимому, не связаны с их способностью снижать уровень липидов. Например, розувастатин, который считается наиболее эффективным статином для ингибирования НМГ-СоА-редуктазы ( $IC_{50}=5,4$  нМ; (McKenney, 2003)) продемонстрировал слабые противофиброзные свойства.

Для оценки того, может ли комбинация статина с NTZ или TZ снижать фиброз синергичным образом, проводили эксперименты с комбинационной матрицей для индуцированных TGF $\beta$  HSC. В кратком изложении, растворы NTZ или TZ и статина подвергали серийному разведению в шахматном порядке, получая матрицу из 36 комбинаций, охватывающую большую панель соотношений статин/NTZ или статин/TZ. Синергию сначала определяли путем вычисления показателей приращения по Блисссу. Для ранжирования различных статинов на основе их синергии также вычисляли сумму показателей ЕОВ, полученных для каждого статина. Эти эксперименты продемонстрировали, что NTZ могли иметь синергическое действие со всеми статинами, но не с одинаковой эффективностью, снижая продукцию  $\alpha$ -SMA в активированных HSC.

Наилучшая синергия была достигнута для NTZ в комбинации с питавастатином (общий показатель ЕОВ 337), за которым следовали симвастатин (общий показатель ЕОВ 255), флувастатин (общий показатель ЕОВ 141), ловастатин (общий показатель ЕОВ 91), правастатин (общий показатель ЕОВ 88) и аторвастатин (общий показатель ЕОВ 73) (фиг. 4B, 5B, 6B, 7B и 8B). Положительный показатель ЕОВ был получен только для нескольких соотношений NTZ/ROSU (данные не представлены), что указывает на синергию, но более слабую, по сравнению с другими комбинациями NTZ/статин. Для подтверждения синергии экспериментальные величины, соответствующие высокому показателю ЕОВ для каждой комбинации NTZ/статин, наносили на столбиковую диаграмму (фиг. 4C, 5C, 6C, 7C и 8C).

На этих графиках показано, что комбинация NTZ с питавастатином, симвастатином, флувастатином, ловастатином, аторвастатином и правастатином демонстрирует лучший противофиброзный эффект, являющийся статистически значимым по сравнению с наилучшим единственным средством (NTZ или статин). Наиболее впечатляющими примерами являются питавастатин, симвастатин или флувастатин, в которых единственные средства обеспечивают слабую противофиброзную активность (ингибирование от ~10 до 20%) в субоптимальных дозах, однако при комбинировании с NTZ достигают ингибирования  $\alpha$ -SMA порядка от 60 до 70%. Тизоксанид, активный метаболит NTZ, также оцененный в комбинации со статинами, продемонстрировал наилучшую синергию с NTZ, а именно питавастатином, симвастатином и флувастатином. Как наблюдали для NTZ, метаболит TZ также имел синергическое действие с этими 3 статинами (пример с флувастатином представлен на фиг. 9).

В дополнение к противофиброзным свойствам, было обнаружено, что комбинация NTZ в дозе 30 мг/кг/сутки с симвастатином в дозе 10 мг/кг/сутки имела синергическое действие, предупреждая появление измененных уровней желчных кислот в кровотоке в модели индуцируемого СС14 повреждения печени (фиг. 10). В заключение заявитель обнаружил неожиданную антихолестатическую и противофиброзную активность для комбинации соединения формулы (I) и статинов. Эти результаты указывают на то, что комбинация соединения формулы (I) со статином может быть синергической и может обеспечивать терапевтическую пользу при множестве типов холестатических и 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.

Chong, L. W., Y. C. Hsu, et al. (2015). "Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells." *BMC Gastroenterol* 15: 22.

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.

Ji, H., H. Tang, et al. (2014). "Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor-beta/Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation." Biomed Rep 2(6): 787-792.

Kavalipati, N., J. Shah, et al. (2015). "Pleiotropic effects of statins." Indian J Endocrinol Metab 19(5): 554-562.

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.

Marrone, G., R. Maeso-Diaz, et al. (2015). "KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins." *Gut* 64(9): 1434-1443.

McFarlane, S. I., R. Muniyappa, et al. (2002). "Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond." *J Clin Endocrinol Metab* 87(4): 1451-1458.

McKenney, J. M. (2003). "Pharmacologic characteristics of statins." *Clin Cardiol* 26(4 Suppl 3): III32-38.

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.

Miyaki, T., S. Nojiri, et al. (2011). "Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats." *Hepatol Res* 41(4): 375-385.

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.

Rombouts, K., E. Kisanga, et al. (2003). "Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and protein synthesis by rat hepatic stellate cells." *J Hepatol* 38(5): 564-572.

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

Rosignol, 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.

Wang, C. Y., P. Y. Liu, et al. (2008). "Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results." *Trends Mol Med* 14(1): 37-44.

Wang, W., C. Zhao, et al. (2013). "Simvastatin ameliorates liver fibrosis via mediating nitric oxide synthase in rats with non-alcoholic steatohepatitis-related liver fibrosis." *PLoS One* 8(10): e76538.

Watts, K. L., E. M. Sampson, et al. (2005). "Simvastatin inhibits growth factor expression and modulates profibrogenic markers in lung fibroblasts." *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(4): 290-300.

Yeganeh, B., E. Wiechec, et al. (2014). "Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease." *Pharmacol Ther* 143(1): 87-110.

Zhou, Q. and J. K. Liao (2009). "Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy." *Curr Pharm Des* 15(5): 467-478.

Zhu, B., A. Q. Ma, et al. (2013). "Atorvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppressing iNOS expression and the CTGF (CCN2)/ERK signaling pathway." *Int J Mol Sci* 14(12): 24476-24491.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Применение синергической комбинации

(i) нитазоксанида (NTZ), дейтерированного производного NTZ (NTZ-D), тизоксанида (TZ) или тизоксанида глюкуронида (TZG) либо фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D, TZ или TZG; и

(ii) по меньшей мере одного статина, выбранного из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина, симвастатина, аторвастатина, ловастатина и правастатина, для лечения фибротического нарушения.

##### 2. Применение синергической комбинации

(i) нитазоксанида (NTZ), дейтерированного производного NTZ (NTZ-D), тизоксанида (TZ) или тизоксанида глюкуронида (TZG) либо фармацевтически приемлемой соли NTZ, NTZ-D, TZ или TZG; и

(ii) по меньшей мере одного статина, выбранного из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина, симвастатина, аторвастатина, ловастатина и правастатина, для лечения холестатического нарушения, выбранного из первичного билиарного холангита (РВС) и первичного склерозирующего холангита.

3. Применение по п.1 или 2, где комбинация находится в форме фармацевтической композиции или набора.

4. Применение по любому из пп.1-3, где статин выбран из группы, состоящей из питавастатина, флувастатина и симвастатина.

5. Применение по любому из пп.1-4, где комбинация дополнительно содержит по меньшей мере одно терапевтически активное средство с известной противфиброзной активностью, выбранное из пирфенидона или ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (RTK), таких как нинтеданиб, сорафениб и других RTK, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого противфиброзного соединения, связанного с препятствованием активизируемым TGFβ и BMP каскадам, включая активаторы латентного комплекса TGFβ, такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегринны клеточной поверхности, рецепторы TGFβ типа I (TGFβRI) или типа II (TGFβRII) и их лиганды, такие как TGFβ, акти-

вин, ингибин, Nodal, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корцепторы (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 $\beta$ -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 $\beta$ .

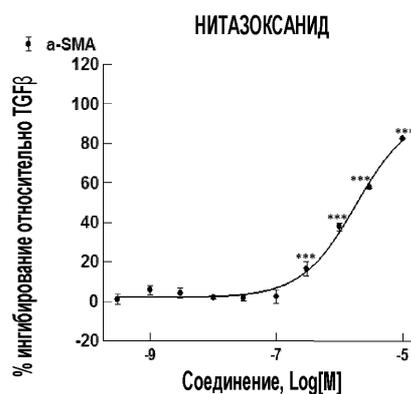
6. Применение по любому из пп.1-5, где комбинация дополнительно содержит по меньшей мере одно терапевтически активное средство, выбранное из ингибиторов JAK/STAT и других противовоспалительных средств и/или иммунодепрессантов.

7. Применение по п.6, где терапевтически активное средство выбрано из глюкокортикоидов, NSAID, циклофосамида, нитрозомочевины, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспори-на, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, финголимода и других модуляторов рецепторов сфингозин-1-фосфата, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины рецепторы провоспалительных цитокинов, T-клеточный рецептор, интегрин.

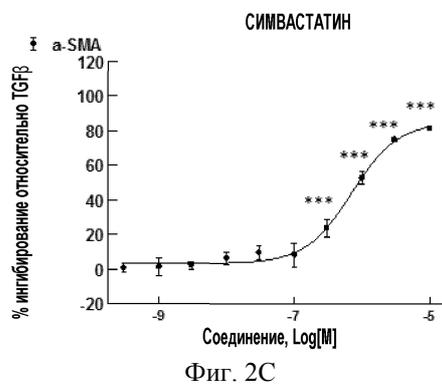
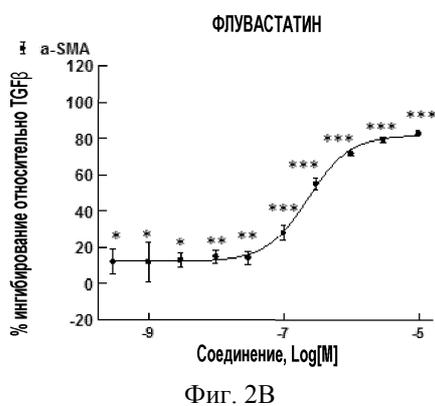
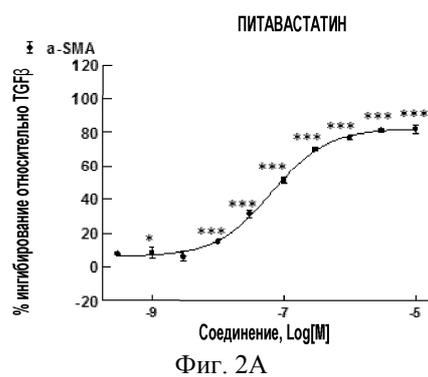
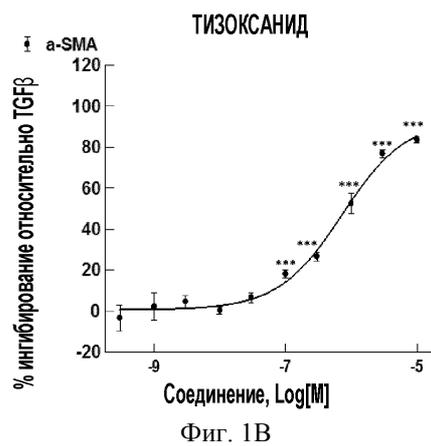
8. Применение по любому из пп.1, 3-7, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечного тракта, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстого кишечника, кишечника, такого как тонкого кишечника, желчных путей, мягких тканей, таких как средостения или забрюшинного пространства, костного мозга, суставов, глаз и желудка.

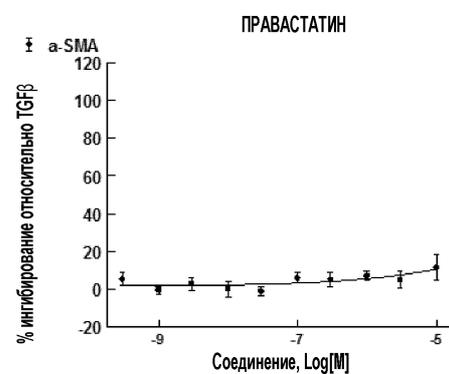
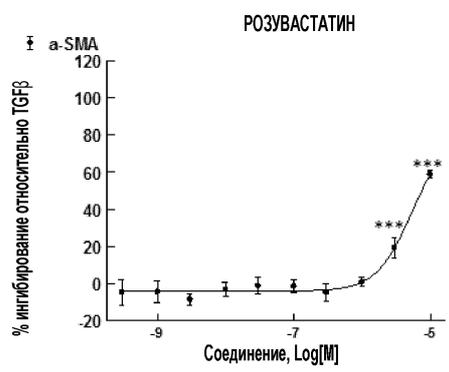
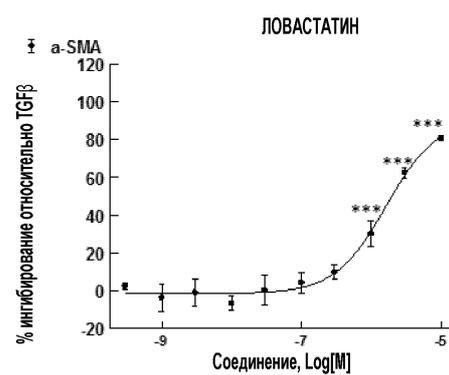
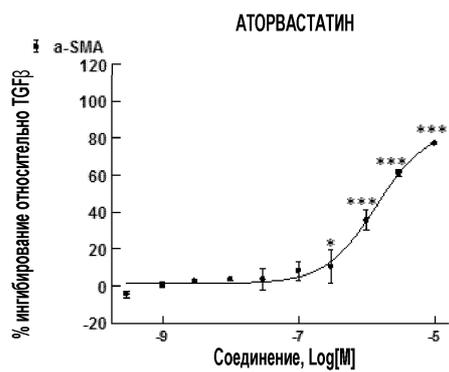
9. Применение по любому из пп.1, 3-7, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечного тракта, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягких тканей, костного мозга, кишечника и суставов.

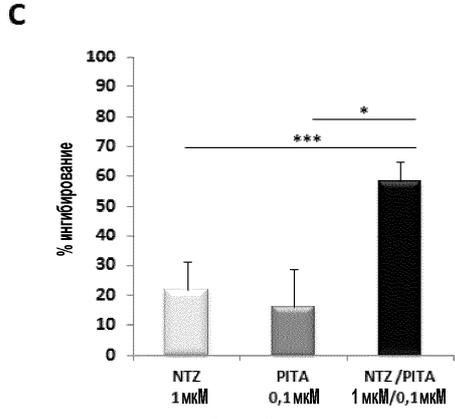
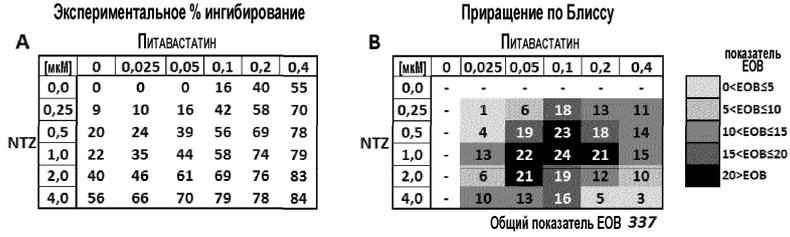
10. Применение по любому из пп.1, 3-9, где фибротическое нарушение выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (NASH), фиброза легких, идиопатического фиброза легких, фиброза кожи, фиброза глаз (такого как фиброз капсулы), эндомикардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, 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.



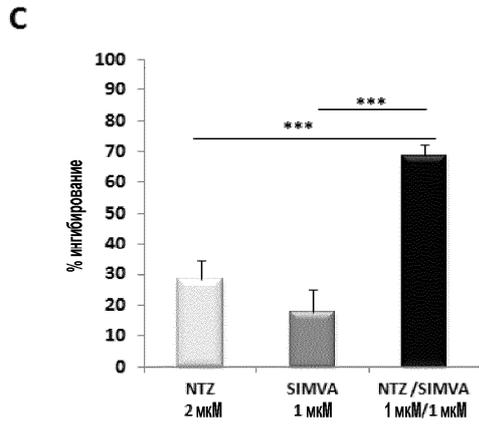
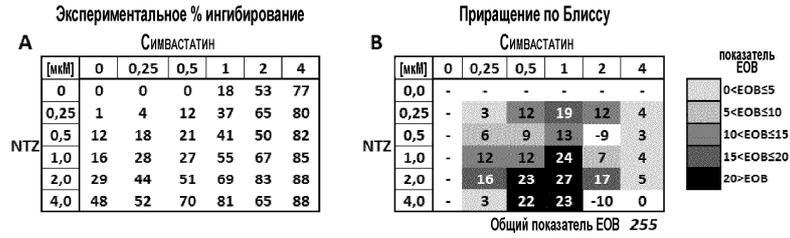
Фиг. 1А



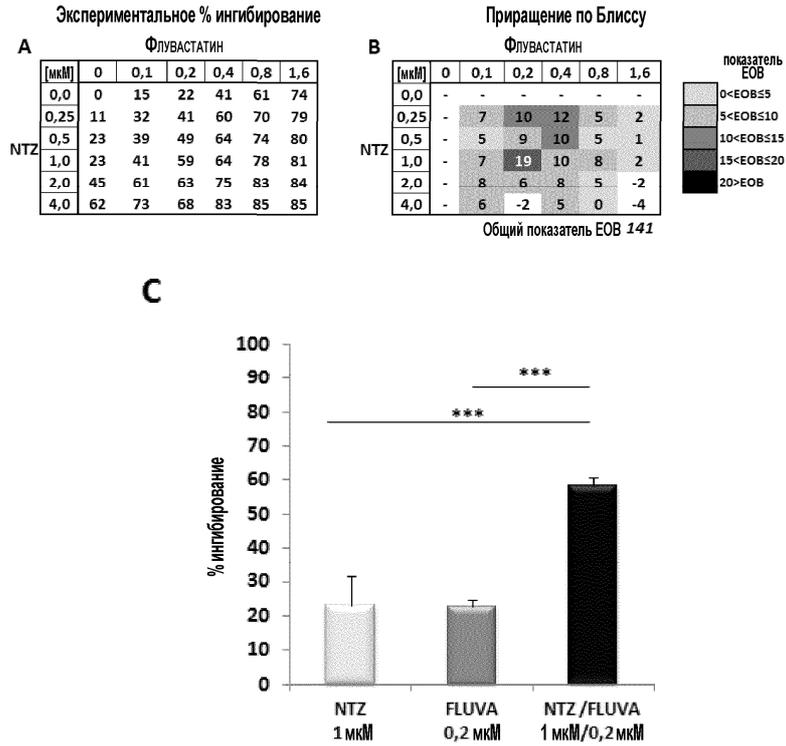




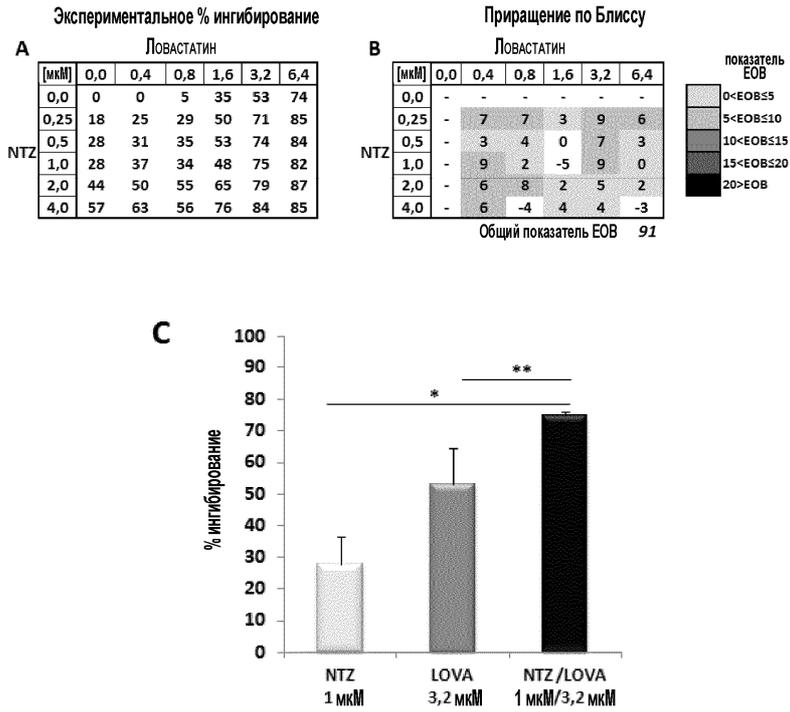
Фиг. 3



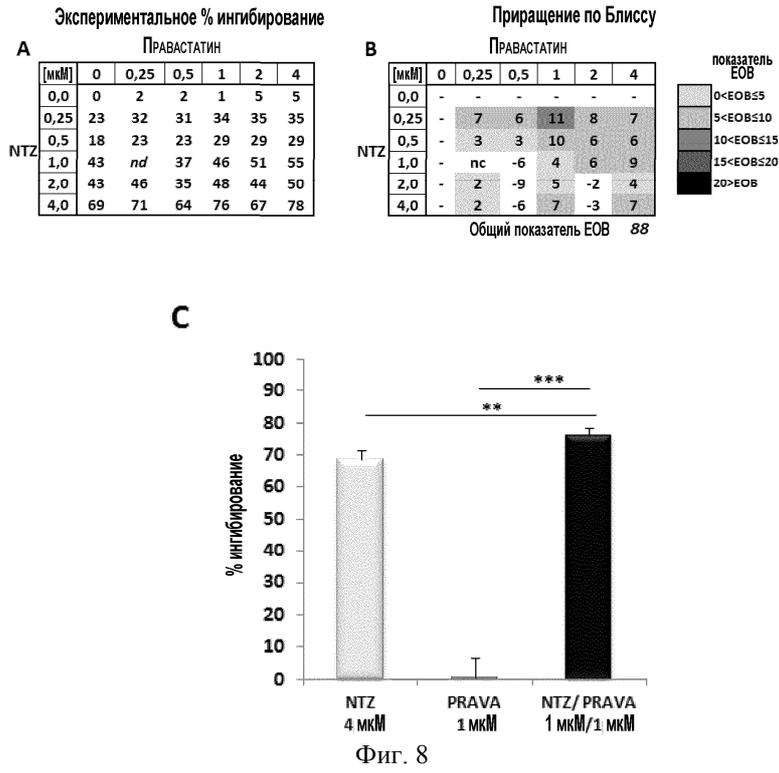
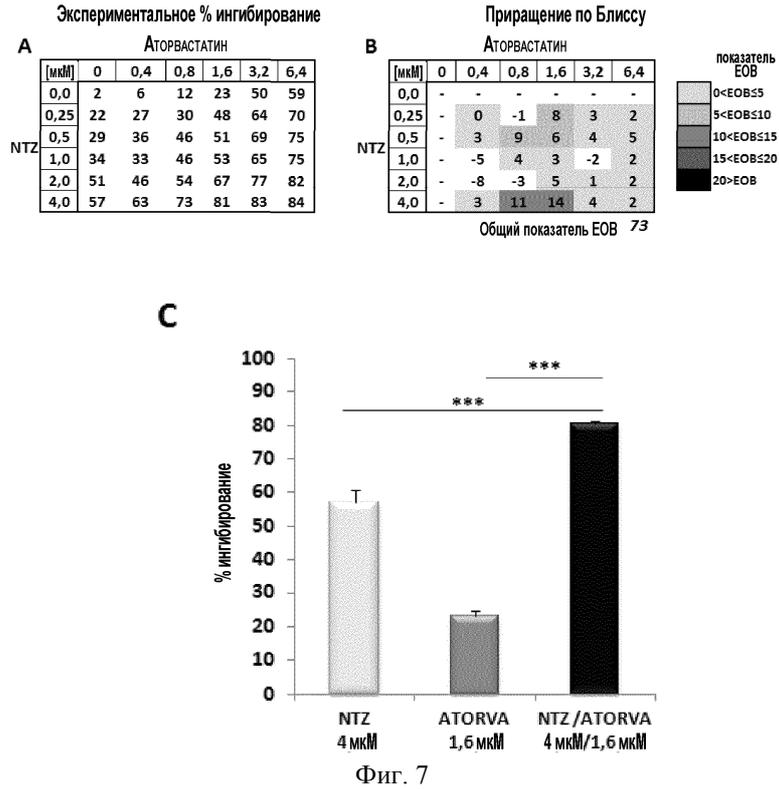
Фиг. 4

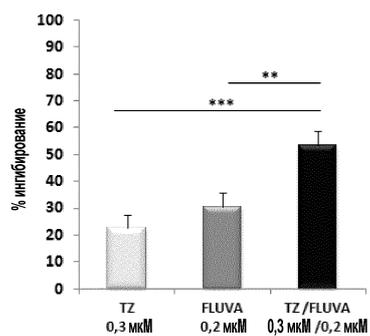


Фиг. 5

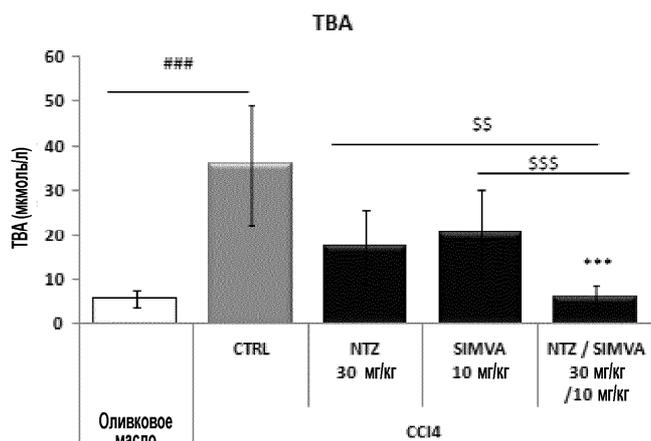


Фиг. 6





Фиг. 9



Фиг. 10

