

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391514** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.18

(22) Дата подачи заявки  
2021.11.16

(51) Int. Cl. *A61K 31/426* (2006.01)  
*A61K 31/7056* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01)  
*A61P 7/10* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

---

(31) 20306396.1; 21199623.6  
(32) 2020.11.17; 2021.09.28  
(33) EP  
(86) PCT/EP2021/081876  
(87) WO 2022/106425 2022.05.27  
(71) Заявитель:  
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:  
Делатай Филипп, Вальчак Роберт,  
Фукар Коринн, Легри Ванесса (FR),  
Станкович Валэнтэн Николя (BE),  
Дебакер Симон, Анф Реми (FR)  
(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к лечению или профилактике печеночной недостаточности.

**202391514**  
**A1**

**202391514**  
**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578151EA/042

### СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Настоящее изобретение относится к лечению или профилактике печеночной недостаточности.

#### **Предпосылки создания изобретения**

Печеночная недостаточность представляет собой тяжелое состояние, когда печень не может выполнять свои нормальные метаболические функции. Проявления печеночной недостаточности включают острую печеночную недостаточность, цирроз и острую печеночную недостаточность на фоне хронической.

#### Острая печеночная недостаточность (ALF)

Термин ALF описывает расстройство, характеризующееся острой потерей функции печени при отсутствии существовавшего ранее хронического заболевания печени. ALF также называют фульминантной печеночной недостаточностью, острым некрозом печени, фульминантным некрозом печени и фульминантным гепатитом.

ALF является редким и тяжелым последствием внезапного повреждения гепатоцитов и может развиваться в течение нескольких дней или недель до летального исхода. Разнообразные повреждения клеток печени приводят к последовательной картине быстро наступающего повышения уровня аминотрансфераз, изменения психики и нарушения свертываемости крови. Отсутствие существующего заболевания печени отличает ALF от печеночной недостаточности вследствие терминальной стадии хронического заболевания печени (декомпенсированный цирроз и острая печеночная недостаточность на фоне хронической, ACLF). При ALF вещества, которые приводят к повреждению гепатоцитов, вызывают либо прямой токсический некроз, либо апоптоз и иммунное повреждение, что является более медленным процессом. Время от появления симптомов до начала печеночной энцефалопатии отличает различные формы острой печеночной недостаточности: прямое, очень быстрое поражение (в течение нескольких часов), называемое сверхострой печеночной недостаточностью; и более медленное, иммунное поражение (от нескольких дней до недель), считающееся острым или подострым. Термин "печеночная энцефалопатия", или HE, используемый в настоящей заявке, относится к возникновению спутанности сознания, измененного уровня сознания и комы в результате печеночной недостаточности. На поздних стадиях это называется печеночной комой или coma hepaticum.

Пятью наиболее распространенными причинами ALF в развитых странах являются токсичность парацетамола (ацетаминофена), ишемия, лекарственное поражение печени, гепатит В и аутоиммунная реакция, на долю которых приходится почти 80% случаев. Гепатиты А, В и Е являются основными причинами ALF в развивающихся странах. Остальные причины ALF составляют менее 15% от общего числа и включают тепловой удар, поражения, связанные с беременностью (например, острую жировую дистрофию печени беременных и синдром HELLP [гемолиз, повышенный уровень печеночных

ферментов и низкий уровень тромбоцитов]), синдром Бадда-Киари, негепатотрофные вирусные инфекции, такие как простой герпес, и диффузно-инфильтрирующие злокачественные новообразования.

Без лечения прогноз неблагоприятный, поэтому решающее значение имеет своевременное выявление и лечение пациентов с острой печеночной недостаточностью. По возможности пациентов с острой печеночной недостаточностью следует лечить в отделении интенсивной терапии в центре трансплантации печени.

### Цирроз печени

Термин "цирроз печени", используемый в настоящей заявке, относится к состоянию, характеризующемуся замещением ткани печени фиброзом и регенеративными узелками, что приводит к потере функции печени вплоть до декомпенсации. Асцит (задержка жидкости в брюшной полости) является наиболее частым осложнением, связанным с декомпенсацией цирроза. Это связано с плохим качеством жизни, повышенным риском инфекции и неблагоприятным результатом лечения в долгосрочной перспективе. Другими потенциально опасными для жизни осложнениями являются печеночная энцефалопатия (спутанность сознания и кома) и кровотечение из варикозно расширенных вен пищевода. Цирроз печени имеет много возможных проявлений. Эти признаки и симптомы могут быть либо прямым результатом недостаточности клеток печени, либо вторичными в результате возникающей портальной гипертензии. Проявления портальной гипертензии включают спленомегалию, гастроэзофагеальный варикоз и портоколлатеральное кровообращение в результате образования венозных коллатеральных вен между портальной системой и околопупочными венами в результате портальной гипертензии.

Цирроз печени подразделяется на две клинические категории: компенсированный и декомпенсированный цирроз.

Термин "компенсированный цирроз", используемый в настоящей заявке, означает, что печень сильно повреждена, но все еще может выполнять многие важные функции организма. Пациенты, страдающие компенсированным циррозом, имеют незначительные симптомы или вообще не имеют симптомов и могут жить без серьезных клинических осложнений. Пациенты на ранних стадиях компенсированного цирроза характеризуются низким уровнем портальной гипертензии и отсутствием варикозно расширенных вен пищевода. Пациенты на поздних стадиях компенсированного цирроза характеризуются более высоким уровнем портальной гипертензии и наличием варикозно расширенных вен пищевода, но без асцита и без кровотечений.

Термин "декомпенсированный цирроз", используемый в настоящей заявке, означает, что печень сильно повреждена и не может нормально функционировать. У пациентов, страдающих декомпенсированным циррозом, развиваются различные симптомы, такие как усталость, потеря аппетита, желтуха, потеря веса, асцит и/или отек, печеночная энцефалопатия и/или кровотечение. Для пациентов на ранних стадиях декомпенсированного цирроза характерно наличие асцита с варикозным расширением вен

пищевода или без него у пациента, никогда не имевшего кровотечений. Пациенты на поздних стадиях декомпенсированного цирроза характеризуются более выраженным асцитом отдельно или в сочетании с кровотечением, бактериальными инфекциями и/или печеночной энцефалопатией. Могут развиваться осложнения, связанные с декомпенсированным циррозом, такие как асцит, отеки, проблемы с кровотечением, потеря костной массы и плотности костей, гепатомегалия, нарушения менструального цикла у женщин и гинекомастия у мужчин, нарушение психического статуса, зуд, нарушение функции почек и атрофия мышц.

#### Острая печеночная недостаточность на фоне хронической (ACLF)

ACLF также является серьезным заболеванием печени, наблюдаемым у пациентов с известным хроническим заболеванием печени, у которых наблюдается острое ухудшение функции печени.

ACLF представляет собой резкое и опасное для жизни ухудшение клинического состояния у пациентов с прогрессирующим циррозом или с циррозом вследствие хронического заболевания печени. Этот синдром характеризуется тремя основными признаками: он обычно возникает в контексте интенсивного системного воспаления, часто развивается в тесной временной связи с провоспалительными провоцирующими событиями (например, инфекциями или алкогольным гепатитом) и связан с недостаточностью одного органа или полиорганной недостаточностью, затрагивающей печень, почки, головной мозг, коагуляцию и/или сердечно-сосудистые функции. Органная недостаточность выявляется с использованием модифицированной шкалы последовательной оценки органной недостаточности (система оценки органной недостаточности Консорциума EASL-CLIF), которая учитывает функцию печени, почек и головного мозга, а также коагуляцию, кровообращение и дыхание, что позволяет стратифицировать пациентов на подгруппы с разным риском смерти. По числу органной недостаточности на момент постановки диагноза пациентов разделяли на четыре прогностические группы (отсутствие острой печеночной недостаточности на фоне хронической и 1, 2 и 3 степени острой печеночной недостаточности на фоне хронической). Предрасположенность к ACLF коррелирует с тяжестью (т.е. прогрессирование фиброза вплоть до цирроза) и этиологией основного хронического заболевания печени. Какой бы ни была этиология хронического заболевания печени, компенсированный цирроз является основным состоянием, связанным с развитием ACLF. Холестатические, метаболические заболевания печени, хронический вирусный гепатит и неалкогольный стеатогепатит (NASH) также относятся к основным хроническим заболеваниям печени. Алкогольный цирроз составляет 50-70% от всех заболеваний печени, лежащих в основе ACLF, в западных странах, тогда как цирроз, связанный с вирусным гепатитом, составляет около 10-30% всех случаев.

Тяжесть основного заболевания можно оценить в баллах с использованием модели для оценки терминальной стадии заболевания печени (MELD).

ACLF требует провоцирующего события, которое происходит на фоне цирроза

и/или хронического заболевания печени, и быстро прогрессирует до полиорганной недостаточности с высокой смертностью. Провоцирующими событиями могут быть реактивация гепатита В или наложенный вирусный гепатит, гепатит, вызванный алкоголем, лекарствами, ишемией, хирургическим вмешательством, сепсисом или идиопатический.

В начале заболевания бактериальная транслокация может играть ключевую роль в прогрессировании от компенсированного до декомпенсированного цирроза печени (на что указывает развитие асцита, варикозное кровотечение, энцефалопатия) через синдром системной воспалительной реакции. Однако около 40% пациентов с ACLF не имеют провоцирующих событий.

Реакция хозяина определяет тяжесть поражения. Воспаление и дисфункция нейтрофилов имеют большое значение в патогенезе ACLF, а выраженный профиль провоспалительных цитокинов вызывает переход от стабильного цирроза печени к ACLF. У этих пациентов воспалительная реакция может привести к иммунной дисрегуляции, что может предрасполагать к инфекции, которая затем усугубит провоспалительный ответ, приводя к замкнутому кругу. Считается, что цитокины играют важную роль в ACLF. Повышенные уровни в сыворотке нескольких цитокинов, включая фактор некроза опухоли (TNF)- $\alpha$ , sTNF- $\alpha$ R1, sTNF- $\alpha$ R2, интерлейкин (IL)-2, IL-2R, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и интерферон- $\alpha$ , были описаны у пациентов с ACLF.

Практически неизменно присутствует гипербилирубинемия, а желтуха считается важным критерием ACLF. Различные авторы использовали различные пороговые уровни желтухи, начиная с билирубина в сыворотке 6-20 мг/дл. Помимо желтухи, еще одним признаком дисфункции печени является коагулопатия. Тесты на коагуляцию обычно аномальны у пациентов с циррозом печени из-за нарушения синтеза и повышенного расходования факторов свертывания крови. Продолжающееся повреждение печени завершается неуклонным усугублением ситуации и смертью.

Помимо печени чаще всего отказывают почки. Почечную недостаточность можно разделить на четыре типа: гепаторенальный синдром, паренхиматозное заболевание, гиповолемия-индуцированная и лекарственно-индуцированная почечная недостаточность. Бактериальная инфекция (например, спонтанный бактериальный перитонит) является наиболее частой провоцирующей причиной почечной недостаточности при циррозе, за которой следует гиповолемия (вследствие желудочно-кишечного кровотечения, чрезмерного лечения диуретиками).

Печеночная энцефалопатия (HE) является одним из частых проявлений ACLF. HE может быть провоцирующим фактором или следствием ACLF. Аммиак занимает центральное место в патогенезе HE. Действительно, многочисленные исследования показали, что гипераммониемия играет критическую роль в развитии HE у пациентов с циррозом печени и другими заболеваниями печени. Из-за печеночной недостаточности большое количество сывороточного аммиака ускользает от печеночного метаболизма и может достигать головного мозга, где такие высокие концентрации аммиака тесно

связаны с высокой частотой отека и вклинения головного мозга.

Кроме того, важным признаком ACLF является набухание головного мозга, как и при ALF.

Одним из признаков ACLF является сердечно-сосудистый коллапс, сходный с таковым у пациентов с ALF. Эта сердечно-сосудистая аномалия связана с повышенным риском смерти, особенно у пациентов с почечной дисфункцией.

Респираторные осложнения при ACLF можно разделить на острую дыхательную недостаточность (например, пневмонию) и те, которые возникают как следствие цирроза (например, портопультмональная гипертензия и гепатопультмональный синдром). У пациентов с циррозом повышен риск развития пневмонии.

У пациентов с ACLF наблюдается статистически более высокий процент смертности при той же балльной оценке по MELD, чем у пациентов без ACLF. Независимо от провоцирующего события конечный общий путь, ведущий к острому ухудшению функции печени и полиорганной недостаточности, по-видимому, представляет собой чрезмерную активацию системного воспаления, за которым затем следует период паралича иммунной системы. Начальный цитокиновый шторм вызывает глубокие изменения макроциркуляции, микроциркуляции и нарушение нормальной функции органов, что приводит к полиорганной недостаточности.

Раннее вмешательство для уменьшения или коррекции поражения имеет решающее значение. Тактика лечения ACLF в настоящее время основана на поддерживающем лечении органной недостаточности, в основном в условиях интенсивной терапии.

Однако доля случаев с предшествующими эпизодами острой декомпенсации (развитие асцита, энцефалопатии, желудочно-кишечного кровотечения, бактериальной инфекции) является очень частой у пациентов с ACLF. Действительно, появление печеночной недостаточности у пациента с циррозом печени является решающим моментом с точки зрения медикаментозного лечения, поскольку это состояние часто связано с быстро развивающейся полиорганной дисфункцией. Отсутствие дезинтоксикации, метаболических и регуляторных функций печени и измененный иммунный ответ приводят к опасным для жизни осложнениям, таким как почечная недостаточность, повышенная восприимчивость к инфекциям, печеночная кома и системная гемодинамическая дисфункция. Более того, только 20% пациентов с прогрессирующим циррозом можно лечить при помощи трансплантации печени.

Существует потребность в адекватном лечении или профилактике печеночной недостаточности, в частности ACLF, ALF и цирроза, в частности декомпенсированного цирроза.

NTZ (нитазоксанид), впервые описанный в 1975 году, показал высокую эффективность против анаэробных простейших, гельминтов и широкого спектра микробов, включая как анаэробные, так и аэробные бактерии. NTZ также может придавать противовирусную активность, а также было показано, что он обладает широкими противораковыми свойствами, вмешиваясь в важные метаболические и проапоптотические

сигнальные пути.

Пилотное исследование пациентов с HE, получавших NTZ и лактулозу, дало результаты, что касается улучшения клинической картины. У пациентов наблюдалось улучшение психического состояния, и лекарственное средство хорошо переносилось (Elrakaybi et al., The clinical effects of nitazoxanide в hepatic encephalopathy patients: a pilot study, JPSR, 2015; Vol. 6(11): 4657-4667). Однако авторы этого исследования не сообщали об улучшении функции печени или функции любого другого органа. Кроме того, уровни аммиака не улучшались после введения NTZ.

К удивлению, как показано в настоящей заявке, NTZ можно использовать для лечения субъекта, страдающего или подверженного риску развития печеночной недостаточности.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение основано на неожиданном наблюдении, что NTZ защищает гепатоциты от индуцированной аммиаком токсичности и улучшает функции печени. Более того, к удивлению, как показано в настоящей заявке, NTZ препятствует декомпенсации в животной модели ACLF.

Соответственно, настоящее изобретение относится к нитазоксаниду (NTZ), тизоксаниду (TZ), тизоксанид глюкурониду (TZG) или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения для применения в способе лечения или профилактики печеночной недостаточности у нуждающегося в этом субъекта. В конкретном варианте осуществления печеночная недостаточность представляет собой ACLF, ALF или цирроз, в частности компенсированный или декомпенсированный цирроз, более конкретно декомпенсированный цирроз. В конкретном варианте осуществления печеночная недостаточность представляет собой ACLF или ALF.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения для применения в способе лечения печеночной недостаточности, выбранной из ACLF и ALF. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения для применения в способе лечения ACLF.

Настоящее изобретение также относится к NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения для применения в способе лечения или профилактики печеночной недостаточности вследствие ACLF, ALF, цирроза или декомпенсации цирроза у нуждающегося в этом субъекта. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения используют в способе лечения или профилактики печеночной недостаточности вследствие ACLF или ALF.

В конкретном варианте осуществления субъект подвержен риску ACLF, ALF или цирроза, в частности декомпенсированного цирроза печени (также указан в настоящей заявке как "субъект, подверженный риску").

В конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF. Соответственно, NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначается для применения в способе лечения ACLF.

В еще одном варианте осуществления субъект имеет ALF. Соответственно, NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначается для применения в способе лечения ALF. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для лечения лекарственно-индуцированной ALF, в частности ацетаминофен-индуцированной ALF.

В еще одном варианте осуществления субъект имеет цирроз печени. В другом конкретном варианте осуществления субъект имеет компенсированный или декомпенсированный цирроз. Еще в одном варианте осуществления субъект имеет декомпенсированный цирроз. В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет компенсированный цирроз, и способ предназначен для предотвращения прогрессирования от компенсированного цирроза до декомпенсированного цирроза.

В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ, TZG или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики декомпенсированного цирроза или реверсии декомпенсированного цирроза к компенсированному циррозу.

В другом варианте осуществления субъект имеет ACLF и цирроз. В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF и компенсированный или декомпенсированный цирроз. Еще в одном варианте осуществления субъект имеет ACLF и декомпенсированный цирроз. В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF и компенсированный цирроз, и способ предназначен для предотвращения прогрессирования от компенсированного цирроза до декомпенсированного цирроза.

В еще одном варианте осуществления субъект, подверженный риску ACLF, имеет цирроз печени, в частности компенсированный или декомпенсированный цирроз, более конкретно декомпенсированный цирроз.

В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF с высоким риском смерти менее чем через 28 дней после госпитализации.

В конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF 1, 2 или 3 степени в соответствии с исследованием CANONIC консорциума EASL-CLIF, в частности ACLF 2 или 3 степени.

В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики ACLF у субъекта с циррозом печени. В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет алкогольный цирроз. В другом конкретном варианте осуществления субъект имеет компенсированный алкогольный цирроз. В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет декомпенсированный алкогольный цирроз.

В другом варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая



соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики ACLF у субъекта с хроническим заболеванием печени. В конкретном варианте осуществления субъект имеет хроническое заболевание печени с циррозом или без цирроза. В конкретном варианте осуществления субъект имеет хроническое заболевание печени с циррозом. В еще одном конкретном варианте осуществления цирроз представляет собой компенсированный или декомпенсированный цирроз, более конкретно декомпенсированный цирроз.

В другом конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе улучшения функции печени у субъекта с печеночной недостаточностью, выбранной из группы, состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В другом конкретном варианте осуществления способ предназначен для улучшения функции печени у субъекта с печеночной недостаточностью, выбранной из группы, состоящей из ACLF и ALF.

В другом конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе улучшения дезинтоксикационной функции печени у субъекта с печеночной недостаточностью, выбранной из группы, состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для улучшения дезинтоксикационной функции печени у субъекта с печеночной недостаточностью, выбранной из группы, состоящей из ACLF и ALF.

В другом конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе предотвращения декомпенсации печени у субъекта с ACLF.

В конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF вместе с по меньшей мере одним провоцирующим событием, таким как инфекция (например, вирусная, грибковая или бактериальная инфекция) или алкогольный гепатит, сепсис, отравление, висцеральное кровотечение и лекарственно-индуцированная печеночная недостаточность (DILI).

В еще одном конкретном варианте осуществления субъект имеет ACLF в результате печеночного провоцирующего состояния (например, вызванного алкоголем), внепеченочного провоцирующего состояния (например, вирусной, грибковой или бактериальной инфекции, сепсиса, реактивации вируса) или и того и другого.

В другом конкретном варианте осуществления субъект имеет риск ACLF с провоцирующим событием. Например, субъект может иметь хроническое заболевание печени с провоцирующим событием. В конкретном варианте осуществления субъект имеет хроническое заболевание печени с провоцирующим событием, с циррозом или без него. В конкретном варианте осуществления субъект имеет хроническое заболевание

печени с провоцирующим событием и циррозом. В еще одном конкретном варианте осуществления цирроз представляет собой компенсированный или декомпенсированный цирроз, более конкретно декомпенсированный цирроз.

В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики внепеченочной органной недостаточности у субъекта с циррозом печени, в частности у субъекта с компенсированным или декомпенсированным циррозом, в частности с декомпенсированным циррозом. В конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой почечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой мозговую недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой легочную недостаточность.

В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики внепеченочной органной недостаточности у субъекта с хроническим заболеванием печени с циррозом, в частности у субъекта с компенсированным или декомпенсированным циррозом, в частности с декомпенсированным циррозом. В конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой почечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой мозговую недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой легочную недостаточность.

В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения внепеченочной органной недостаточности у субъекта с ACLF. В конкретном варианте осуществления внепеченочная органная недостаточность, лечение которой осуществляют, представляет собой почечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления внепеченочная органная недостаточность, лечение которой осуществляют, представляет собой мозговую недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой легочную недостаточность.

В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически

приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики внепеченочной органной недостаточности у субъекта с ACLF. В конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой почечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой мозговую недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность. В другом конкретном варианте осуществления предотвращаемая внепеченочная органная недостаточность представляет собой легочную недостаточность.

В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе защиты субъекта от индуцированного аммиаком поражения, при этом указанный субъект страдает или подвержен риску печеночной недостаточности, выбранной из группы состоящей из ACLF, ALF и декомпенсированного цирроза.

В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или профилактики HE. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для лечения или профилактики HE и, кроме того, для предотвращения отека головного мозга. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или профилактики HE у субъекта с печеночной недостаточностью, такой как печеночная недостаточность, выбранная из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или профилактики HE у субъекта с риском развития печеночной недостаточности, например, с риском развития печеночной недостаточности, выбранной из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики HE у субъекта с печеночной недостаточностью, такой как печеночная недостаточность, выбранная из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе профилактики HE путем защиты головного мозга от индуцированного аммиаком поражения у субъекта, имеющего или подверженного риску

печеночной недостаточности, выбранной из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза.

В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или предотвращения отека головного мозга. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или предотвращения отека головного мозга у субъекта с печеночной недостаточностью, такой как печеночная недостаточность, выбранная из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе лечения или предотвращения отека головного мозга у субъекта с риском развития печеночной недостаточности, например, с риском развития печеночной недостаточности, выбранной из группы, состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе предотвращения отека головного мозга у субъекта с печеночной недостаточностью, такой как печеночная недостаточность, выбранная из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В еще одном конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения предназначены для применения в способе предотвращения отека головного мозга путем защиты головного мозга от индуцированного аммиаком поражения у субъекта, имеющего или подверженного риску печеночной недостаточности, выбранной из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 представляет график, показывающий активность протеазы в мертвых клетках после обработки с или без NTZ. Защитный эффект NTZ на хлорид аммония ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )-индуцированную смертность оценивали в клетках HepG2. Доза-ответ NTZ оценивали при низких (60 мМ) и высоких (120 мМ) концентрациях  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Смертность клеток оценивали путем измерения активности протеазы. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. §  $p < 0,05$  с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни по сравнению с контролем без  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . α, αα, ααα  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  с использованием непараметрического критерия Крускала-Уоллиса по сравнению с той же дозой  $\text{NH}_4\text{Cl}$  без NTZ (NTZ 0 мкМ).

Фиг. 2 представляет репрезентативные изображения срезов печени при ТАА-индуцированном циррозе у крыс. Окрашенные гематоксилином, эозином и сафранином срезы печени крыс после 16 недель введения ТАА, получавших или не получавших NTZ в течение последних 4 недель. Фиброзные перегородки (черные) окружают печеночные узелки (серые) как признак цирроза. Портальный тракт и сосуды показаны белым цветом.

Фиг. 3 представляет график, представляющий уровень общего билирубина в плазме у крыс с циррозом печени, получавших или не получавших NTZ. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. §, §§, §§§:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни по сравнению с ТАА контролем.

Фиг. 4 представляет график, представляющий уровень альбумина в плазме у крыс с циррозом печени, получавших или не получавших NTZ. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. \*, \*\*:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  с использованием t-критерия Стьюдента по сравнению с ТАА контролем.

Фиг. 5 схематически представляет протокол индукции ACLF и обработки с использованием NTZ.

Фиг. 6 представляет график, показывающий кривые выживаемости после инъекции LPS у крыс с циррозом печени, обработанных NTZ или не обработанных (носитель, veh).  $P = 0,058$  для сравнения кривых выживаемости с использованием критерия Мантеля-Кокса.

Фиг. 7 представляет график, показывающий общий уровень желчных кислот в плазме у крыс с циррозом печени, обработанных NTZ или не обработанных (носитель, veh), после индукции ACLF. \*  $p < 0,05$  с использованием t-критерия Стьюдента.

Фиг. 8 представляет график, показывающий что NTZ уменьшает отек мозга у крыс с BDL+LPS-индуцированной ACLF. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  с использованием t-критерия Стьюдента.

Фиг. 9 представляет график, показывающий, что NTZ улучшает функцию почек у крыс с BDL+LPS-индуцированной ACLF. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  с использованием критерия Манна-Уитни.

Фиг. 10 представляет график, показывающий, что NTZ снижает AST в плазме после интоксикации ацетаминофеном. Гистограмма, представляющая среднее значение и стандартное отклонение. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  с использованием ANOVA и критерия множественных сравнений Даннета.

Фиг. 11 представляет график, показывающий, что обработка препаратом NTZ предотвращает повреждение почек. Гистограммы, представляющие среднее значение и стандартное отклонение концентраций креатинина, мочевины и цистатина С в плазме. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Уэлча.

Фиг. 12 представляет график, показывающий, что NTZ значительно снижает уровни ALT и AST у животных, получавших CCl4+LPS. Экспериментальные результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде

гистограмм. Сравнение между группами было протестировано с использованием t-критерия Стьюдента для всех переменных с нормальным распределением (#:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ ; ###:  $p < 0,001$ ). Критерий Уэлча применяли в случае неравных дисперсий между группами ( $\alpha$ :  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ). Логарифмическое преобразование применяли к уровням ALT и AST в плазме во всех образцах для получения нормального распределения данных.

Фиг. 13 представляет график, показывающий, что NTZ значительно снижает уровень GGT у животных, обработанных CCl<sub>4</sub>+LPS. Экспериментальные результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде гистограмм. Применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (\$:  $p < 0,05$ ; \$\$:  $p < 0,01$ ; \$\$\$:  $p < 0,001$ ).

Фиг. 14 представляет график, показывающий, что NTZ предотвращает LPS-индуцированное изменение функции печени, о чем свидетельствует его действие по снижению общего билирубина и восстановлению продукции альбумина. Результаты экспериментов выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде гистограмм. Критерий Уэлча применяли в случае неравных дисперсий между группами ( $\alpha$ :  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ). Применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (\$:  $p < 0,05$ ; \$\$:  $p < 0,01$ ; \$\$\$:  $p < 0,001$ ).

Фиг. 15 представляет график, показывающий, что NTZ предотвращает LPS-индуцированную почечную недостаточность, о чем свидетельствует снижение уровня креатинина в плазме, мочевины и цистатина С. Экспериментальные результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде гистограмм. Применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (\$:  $p < 0,05$ ; \$\$:  $p < 0,01$ ; \$\$\$:  $p < 0,001$ ).

Фиг. 16 представляет график, показывающий, что NTZ имеет воспалительный эффект в модели ACLF, о чем свидетельствует его способность снижать уровень LPS-индуцированного сывороточного IFN $\gamma$ . Экспериментальные результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде гистограмм. Сравнение между группами было протестировано с использованием t-критерия Стьюдента для всех переменных с нормальным распределением (#:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ ; ###:  $p < 0,001$ ).

### **Подробное описание изобретения**

Субъектом, нуждающимся в лечении, предусмотренном в настоящем изобретении, является пациент с печеночной недостаточностью. В конкретном варианте осуществления субъектом является пациент с печеночной недостаточностью, выбранной из группы состоящей из ACLF, ALF и цирроза, такого как компенсированный или декомпенсированный цирроз, более конкретно декомпенсированный цирроз.

Альтернативно, субъектом, нуждающимся в лечении, предусмотренном в настоящем изобретении, является пациент с риском печеночной недостаточности, выбранной из ACLF, ALF и цирроза, в частности компенсированного или декомпенсированного цирроза, более конкретно декомпенсированного цирроза. В

частности, субъектом может быть пациент с риском декомпенсации цирроза или ACLF вследствие хронического заболевания печени.

Термин "субъект" или "пациент", используемый в настоящей заявке, относится к млекопитающему, предпочтительно к человеку.

ACLF представляет собой полиорганный синдром, который обычно встречается у пациентов с циррозом печени, по меньшей мере с недостаточностью одного органа и с высокой краткосрочной смертностью. ACLF развивается у больных с хроническими заболеваниями печени в ответ на наложенные провоцирующие факторы.

В конкретном варианте осуществления субъект страдает хроническим заболеванием печени с циррозом и имеет риск развития ACLF.

Термин "хроническое заболевание печени" используется в настоящей заявке для обозначения заболеваний печени, связанных с хроническим повреждением печени, независимо от основной причины. Хроническое заболевание печени может возникать, например, в результате злоупотребления алкоголем (алкогольный гепатит), вирусных инфекционных (например, вирусный гепатит А, В, С, Е) или аутоиммунных процессов (аутоиммунный гепатит), неалкогольного стеатогепатита (NASH), рака или хронического механического или химического повреждения печени, или в результате рака. Химическое повреждение печени может быть вызвано различными веществами, такими как токсины, алкоголь, тетрахлорид углерода, трихлорэтилен, железо или лекарственные препараты.

В конкретном варианте осуществления субъект имеет хроническое заболевание печени с циррозом. В конкретном варианте осуществления субъект имеет цирроз вследствие:

- злоупотребления алкоголем,
- вирусного гепатита (такого как вирусный гепатит в результате заражения вирусом гепатита А, В, С, D, Е или G),
- применения лекарственных препаратов,
- метаболического заболевания,
- билиарного заболевания,
- первичного билиарного холангита,
- первичного склерозирующего холангита или
- NASH.

Настоящее изобретение особенно подходит для предотвращения рецидива или лечения ACLF.

В конкретном варианте осуществления субъект с декомпенсацией цирроза или ACLF демонстрирует высокий балл по MELD. Термин "оценка по шкале MELD" или "Модель терминальной стадии заболевания печени" в контексте настоящей заявки относится к системе оценки тяжести дисфункции печени. Для оценки по MELD используют определенные у пациента значения сывороточного билирубина, сывороточного креатинина и международное отношение протромбинового времени (INR) для прогнозирования выживаемости. Она рассчитывается по следующей формуле:

$MELD=3,78 [Ln \text{ сывороточного билирубина (мг/дл)}] + 11,2 [Ln \text{ INR}] + 9,57 [Ln \text{ сывороточного креатинина (мг/дл)}] + 6,43$ , где Ln означает логарифм Напьера.

Билирубин представляет собой желтый продукт распада нормального катаболизма гема. Билирубин выделяется с желчью и мочой. Большая часть билирубина (70-90%) образуется в результате деградации гемоглобина и, в меньшей степени, из других гемопротеинов. В сыворотке билирубин обычно измеряется как в виде прямого билирубина, так и общего билирубина. Прямой билирубин коррелирует с конъюгированным билирубином и включает как конъюгированный билирубин, так и билирубин, ковалентно связанный с альбумином. Непрямой билирубин коррелирует с неконъюгированным билирубином. Уровень билирубина в сыворотке можно измерить любым подходящим способом, известным в данной области. Иллюстративные неограничивающие примеры способов определения билирубина в сыворотке включают способы с использованием диазо реагента, способы с DPD, способы с билирубиноксидазой или способы прямого спектрофотометрического определения билирубина. Вкратце, способ определения уровней билирубина в сыворотке с использованием диазо реагентов основан на образовании азобилирубина, который действует как индикатор, путем добавления смеси сульфаниловой кислоты и нитрита натрия. Способ, основанный на определении сывороточного билирубина с использованием DPD, основан на том факте, что билирубин взаимодействует с солью 2,5-дихлорбензолдиазония (DPD) в 0,1 моль/HCl с образованием азобилирубина с максимальным поглощением при 540-560 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации билирубина. Неконъюгированный билирубин, реагирующий в присутствии детергента (например, Triton TX-100), определяют как общий билирубин, тогда как только конъюгированный билирубин реагирует в отсутствие детергента. Способ определения уровня билирубина в сыворотке крови при помощи билирубиноксидазы основан на реакции, катализируемой ферментом билирубиноксидазой, который окисляет билирубин до биливердина с максимальным поглощением при 405-460 нм. Концентрация билирубина пропорциональна измеренному поглощению. Концентрацию общего билирубина определяют добавлением додецилсульфата натрия (SDS) или холата натрия, что вызывает отделение неконъюгированного билирубина от альбумина и реакцию преципитации. Уровень сывороточного билирубина также можно определить прямым спектрофотометрическим методом при 454 нм и 540 нм. Измерение на этих двух длинах волн используют для уменьшения интерференции гемоглобина.

Термин "международное отношение протромбинового времени" или "INR", используемый в настоящей заявке, относится к параметру, используемому для определения склонности крови к свертыванию. INR представляет собой отношение протромбинового времени пациента к нормальному (контрольному) образцу, возведенное в степень значения ISI для используемой аналитической системы. Протромбиновое время (PT) измеряет факторы I (фибриноген), II (протромбин), V, VII и X и используется в



сочетании с активированным частичным тромбопластиновым временем. Протромбиновое время представляет собой время, необходимое для свертывания плазмы после добавления тканевого фактора. Это измеряет внешний путь свертывания крови. INR стандартизирует результаты протромбинового времени и рассчитывается по следующей формуле:  $INR = (PT_{\text{тест}} / PT_{\text{норма}}) < ISI >$

Значение ISI формулы представляет собой международный индекс чувствительности для любого тканевого фактора и указывает, как конкретная партия тканевого фактора сравнивается с международным эталонным тканевым фактором. ISI обычно составляет от 1,0 до 2,0.

Значение оценки по MELD сильно коррелирует с краткосрочной смертностью: чем ниже значение оценки по MELD, тем ниже смертность, а чем выше значение оценки по MELD, тем выше смертность. Таким образом, пациенты с низкой оценкой по MELD, например, MELD ниже 9, имеют 3-месячную смертность примерно 1,9%, тогда как пациенты с высокой оценкой по MELD, например, MELD 40 или более, имеют 3-месячную смертность примерно 71,3%.

Термин "высокая оценка по MELD", используемый в настоящей заявке, относится к пациенту, имеющему оценку по MELD выше 9, например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или более. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение применяется к субъекту, имеющему оценку по MELD выше 20.

В другом конкретном варианте осуществления у подлежащего лечению пациента наблюдается нарушение функции почек. Термин "нарушение функции почек", также известный как "нарушение почечной функции", "почечное нарушение (расстройство)", "почечная недостаточность", "почечное нарушение" и "отказ почек" в контексте настоящей заявки относится к медицинскому состоянию, при котором почки не в состоянии адекватно фильтровать продукты жизнедеятельности из крови. Поражение почек в основном определяется снижением скорости клубочковой фильтрации, скорости, с которой кровь фильтруется в клубочках почек. При почечной недостаточности могут быть проблемы, связанные с повышенным содержанием жидкости в организме (что приводит к отекам), повышенным уровнем кислотности, повышенными уровнями калия, пониженными уровнями кальция, повышенным уровнем фосфатов, а на более поздних стадиях - анемия.

Субъекты, страдающие печеночной недостаточностью с HE, которые могут получить пользу от настоящего изобретения, могут быть идентифицированы благодаря полимерсомам и способам с их использованием, раскрытым в WO2019053578.

Термин "лечение" в контексте настоящей заявки относится как к терапевтическим мерам, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Благоприятные или желаемые клинические результаты

включают, но не ограничиваются этим, облегчение симптомов, стабилизацию патологического состояния (в частности, без ухудшения), замедление или остановку прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение патологического состояния. В частности, в целях настоящего изобретения лечение направлено на замедление прогрессирования поражения печени и снижение риска дальнейших осложнений. Это также может включать пролонгирование выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

В контексте настоящего изобретения NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве. В конкретном варианте осуществления вводят NTZ или TZ, или его фармацевтически приемлемую соль. Еще в одном варианте осуществления субъекту вводят NTZ или его фармацевтически приемлемую соль, в частности NTZ.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, эффективному для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество лекарственного средства может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, а также способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты препарата перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Эффективные дозировки и схемы введения лекарственного средства зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистом в данной области. Врач, обладающий обычными знаниями в данной области, может легко определить и прописать необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач может начать лечение с более низких уровней доз лекарственного средства, используемого в фармацевтической композиции, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. В общем, подходящей дозой композиции по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта в соответствии с конкретной схемой введения. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше.

NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения можно сформулировать в фармацевтическую композицию, дополнительно включающую один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей (например, солевые растворы, физиологические растворы, изотонические растворы и т.д.), совместимых с фармацевтическим применением и хорошо известных специалистам в данной области техники.

Эти композиции также могут дополнительно включать один или несколько агентов или носителей, выбранных из числа диспергаторов, солюбилизаторов, стабилизаторов,

консервантов и т.д. Агенты или носители, подходящие для этих композиций (жидкие, и/или инъекционные, и/или твердые) представляют собой, в частности, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полисорбат 80, маннит, желатин, лактозу, растительные масла, аравийскую камедь, липосомы и т.д.

Эти композиции могут быть сформулированы в форме суспензий для инъекций, сиропов, гелей, масел, мазей, пилюль, таблеток, суппозиториях, порошков, гелевых капсул, капсул, аэрозолей и т.д., в ряде случаев с использованием галеновых форм или устройств, обеспечивающих пролонгированное и/или медленное высвобождение. Для композиций такого типа можно преимущественно использовать такие вещества, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

NTZ или TZ(G) могут быть в форме фармацевтически приемлемых солей, особенно кислотных или основных солей, совместимых с фармацевтическим применением. Соли NTZ и TZ(G) включают фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированного аммония. Эти соли можно получить на стадии конечной очистки соединения или путем включения соли в предварительно очищенное соединение.

NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения можно вводить разными путями и в разных формах. Например, соединение(соединения) можно вводить системно, перорально, парентерально, путем ингаляции, при помощи назального спрея, назальной инстилляцией или путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, чрескожным путем, местным путем, внутриартериальным путем и т.д. Конечно, способ введения будет адаптирован к форме лекарственного средства в соответствии с процедурами, хорошо известными специалистам в данной области.

В конкретном варианте осуществления соединение формулируют в виде таблетки. В другом конкретном варианте осуществления соединение вводят перорально.

Частота и/или доза, что касается введения, могут быть адаптированы специалистом в данной области в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, NTZ или TZ(G) можно вводить в дозе от 0,01 мг/день до 4000 мг/день, например от 50 мг/день до 2000 мг/день, например от 100 мг/день до 2000 мг/день; и в частности от 100 мг/день до 1000 мг/день. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения вводят в дозе около 1000 мг/день, в частности при 1000 мг/день. В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения вводят перорально в дозе около 1000 мг/день, в частности при 1000 мг/день, в частности в виде таблетки. Введение можно осуществлять ежедневно или даже несколько раз в день, если это необходимо. В одном варианте осуществления соединение вводят по меньшей мере один раз в день, например один раз в день, два раза в день или три раза в день. В конкретном варианте осуществления соединение вводят один или два раза в день. В частности, пероральное

введение можно осуществлять один раз в день во время еды, например, во время завтрака, обеда или ужина, принимая таблетку, включающую соединение в дозе около 1000 мг, в частности в дозе 1000 мг. В другом варианте осуществления таблетку вводят перорально два раза в день, например, путем введения первой таблетки, включающей соединение в дозе около 400 мг, около 500 мг или около 600 мг, в частности в дозе 500 мг, во время одного приема пищи, с введением второй таблетки, включающей соединение в дозе около 500 мг, в частности в дозе 500 мг, во время другого приема пищи в тот же день.

В контексте настоящего изобретения термин "около" применяемый к числовому значению, означает значение  $\pm 10\%$ . Для ясности это означает, что "около 100" относится к значениям, находящимся в диапазоне 90-110. Кроме того, в контексте настоящего изобретения термин "около X", где X представляет собой числовое значение, также конкретно раскрывает значение X, а также более низкое и более высокое значение диапазона, определенного указанным образом, более конкретно значение X.

Целесообразно, чтобы курс лечения с использованием NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения составлял по меньшей мере 1 неделю, в частности по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 24 недель или более. В конкретном варианте осуществления курс лечения составляет по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца или по меньшей мере 3 месяца. В конкретном варианте осуществления курс лечения составляет по меньшей мере 1 год или более в зависимости от состояния субъекта, которого лечат.

В конкретном варианте осуществления NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения ("лекарственное средство") предназначены для применения в качестве единственного активного ингредиента для лечения или профилактики, раскрытых в настоящей заявке.

В еще одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в комбинированной терапии.

В конкретном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в комбинации с терапией против провоцирующего события.

В конкретном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в комбинации с терапией против печеночного провоцирующего состояния или внепеченочного провоцирующего состояния.

В конкретном варианте осуществления провоцирующим событием является бактериальная, грибковая или вирусная инфекция. Соответственно, лекарственное средство можно комбинировать с противомикробным или противовирусным средством. Наиболее подходящее средство будет выбрано в зависимости от организма или вируса, действие которых связано с настоящим изобретением, как это хорошо известно в данной области. В конкретном варианте осуществления провоцирующим фактором является реактивация вируса гепатита В. В этом случае лекарственное средство можно комбинировать с нуклеозидами или нуклеозидными аналогами. Иллюстративные противовирусные лекарственные средства включают, без ограничения, тенофовир,

тенофовир алафенамид и энтекавир.

В другом конкретном варианте осуществления провоцирующим событием является острое кровотечение из варикозно расширенных вен. Следовательно, лекарственное средство можно комбинировать с сосудосуживающим средством, таким как терлипессин, соматостатин, или аналогами, такими как октреотид или вапреотид, в частности октреотид. Такое лечение может сопровождать эндоскопическую терапию (предпочтительнее эндоскопическое лигирование варикозно расширенных вен, выполняемое при диагностической эндоскопии менее чем через 12 часов после поступления). Также может применяться краткосрочная антибиотикопрофилактика, например цефтриаксон.

В другом конкретном варианте осуществления провоцирующим событием является алкогольный гепатит. Следовательно, лекарственное средство можно комбинировать с преднизолоном, который показан больным с тяжелым алкогольным гепатитом.

В другом конкретном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в комбинации с поддерживающей терапией.

В конкретном варианте осуществления поддерживающая терапия представляет собой сердечно-сосудистую поддержку. Например, лекарственное средство можно комбинировать с терапией острого повреждения почек, такой как отмена диуретиков или увеличение объема (с внутривенным введением альбумина). Лекарственное средство также можно комбинировать с сосудосуживающими средствами, такими как терлипессин или норэпинефрин, в частности, если отсутствует ответ на увеличение объема.

В конкретном варианте осуществления поддерживающая терапия представляет собой лечение энцефалопатии. Например, лекарственное средство можно комбинировать с лактулозой. При желании лечение лактулозой можно дополнить клизмами для очистки кишечника. Если у субъекта тяжелая печеночная энцефалопатия, резистентная к лактулозе, можно использовать альбуминовый диализ. В еще одном конкретном варианте осуществления лекарственное средство можно комбинировать с рифаксиминем. Еще в одном варианте осуществления лекарственное средство можно комбинировать с лактитом.

В еще одном конкретном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для применения в комбинации с поглотителями токсинов на основе липосом, такими как поглотители аммиака. В частности, поглотитель токсинов на основе липосом может представлять собой интраперитонеальную жидкость на основе липосом, которую можно использовать, в частности, для усиления клиренса аммиака, в частности аммиака, накопленного при декомпенсированном циррозе печени.

Было описано интраперитонеальное введение везикул (например, липосом) с допустимой дистанционной нагрузкой (например, трансмембранные липосомы с градиентом pH) как интересный подход для лечения передозировки лекарственными средствами и интоксикаций эндогенными метаболитами (например, гипераммониемией) (Forster et al. *Sci Transl Med* 2014; 6: 258ra141). Как указано выше, гипераммониемия

связана с НЕ. Комбинация NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения с таким интраперитонеальным введением поглотителей токсинов на основе липосом может, таким образом, быть выгодной в контексте настоящего изобретения.

В частности, WO 2014/023421 описывает липосомальные везикулы для применения при перитонеальном диализе у пациентов, страдающих эндогенными или экзогенными токсикопатиями, в частности гипераммониемией, где рН внутри липосом отличается от рН в брюшной полости и где рН в липосоме приводит к инкапсулированному в липосомы заряженному токсину. Липосомальный препарат может включать везикулы различной природы, состава, размера и характеристик, заключающие в себе водную среду с различным составом, рН и осмотической силой. В предпочтительных вариантах воплощения липосомоподобные везикулы получены из полимеров и не включают липидов, по этой причине они формально не считаются липосомами и называются полимерсомами. Эти полимерсомы можно вводить в любой форме или любым способом, который делает липосомы или липосомоподобные везикулы, т.е. полимерсомы или ниосомы, биодоступными в брюшной полости. Можно добавить стадию удаления липосом из брюшной полости либо после, либо одновременно со стадией введения. В конкретном варианте осуществления рН внутри липосомных везикул составляет от 1 до 6,5, что приводит к инкапсулированному в липосомы заряженному токсину, при этом липосомный бислой включает в качестве основного компонента природный или синтетический фосфолипид, и при этом диаметр липосомальных везикул составляет более 700 нм. В другом конкретном варианте осуществления природный или синтетический фосфолипид представляет собой длинный насыщенный фосфолипид. В другом конкретном варианте осуществления природный или синтетический фосфолипид представляет собой длинный насыщенный фосфолипид, имеющий алкильную цепь из более чем 12 атомов углерода. В еще одном варианте осуществления природный или синтетический фосфолипид представляет собой длинный насыщенный фосфолипид, имеющий алкильную цепь из более чем 14 атомов углерода. В еще одном конкретном варианте осуществления природный или синтетический фосфолипид представляет собой 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DMPE); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE); 1,2-диолеоил-SA7-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE); 1-миристоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (MPPC); 1-пальмитоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PMPC); 1-стеароил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (SPPC); 1-пальмитоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PSPC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-[фосфо-рац-(1-глицерин)] (DMPG); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-[фосфо-рац-(1-глицерин)] (DPPG); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-[фосфо-рац-(1-глицерин)](DSPG); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-[фосфо-рац-(1-глицерин)] (DOPG); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-

фосфат (DMPA); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфат (DPPA); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-[фосфо-L-серин] (DPPS); или L-α-фосфатидилхолин из куриного яйца (EPC) или из сои (SPC). В еще одном варианте осуществления природный или синтетический фосфолипид представляет собой 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC). Еще в одном варианте осуществления липосомальный бислой дополнительно включает стерический стабилизатор, при этом концентрация стерического стабилизатора, которым могут быть пегилированные липиды, в композиции липосом может варьироваться от 0 до 30 моль%. В другом варианте осуществления липосомальный бислой включает от 0,5 до 20 моль% пегилированных липидов. В другом варианте осуществления пегилированные липиды представляют собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG). В еще одном варианте осуществления диаметр липосомальных везикул превышает 800 нм. Еще в одном варианте осуществления диаметр липосомальных везикул составляет от 700 нм до 10 мкм. В другом варианте осуществления pH в липосомальных везикулах составляет от 1,5 до 5, более предпочтительно от 1,5 до 4.

Эти липосомальные везикулы могут быть получены в соответствии со способами, раскрытыми в WO 2014/023421 и WO 2016/177741.

WO 2018/033856 описывает трансмембранные полимерсомы с градиентом pH и их применение для удаления аммиака и его метилированных аналогов (например, триметиламина (TMA)). Способы получения таких полимерсом также раскрыты в WO 2018/033856. NTZ, TZ(G) или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения можно комбинировать с такими полимерсомами в качестве поглотителей токсинов на основе липосом. В конкретном варианте осуществления полимерсома включает (а) мембрану, которая включает блок-сополимер поли(стирола) (PS) и поли(этиленоксида) (PEO), где молекулярно-массовое отношение PS/PEO выше 1,0 и ниже 4,0; и (б) ядро, которое заключает в себе кислоту. В еще одном варианте осуществления блок-сополимер представляет собой диблок-сополимер. Еще в одном варианте осуществления кислота присутствует в концентрации, обеспечивающей pH от 1 до 6, когда полимерсома гидратирована. В одном варианте осуществления кислота находится в водном кислотном растворе. В еще одном варианте осуществления pH водного кислотного раствора составляет от 1 до 6, в частности, от 2 до 5 или предпочтительно от 2 до 4. В другом варианте осуществления кислота представляет собой оксикислоту, наиболее предпочтительно лимонную кислоту. В другом варианте осуществления полимерсомы получают способом, включающим смешивание органического растворителя, содержащего сополимер, с водной фазой, содержащей кислоту. В еще одном варианте осуществления органический растворитель не смешивается с водой или частично смешивается с водой. В одном варианте осуществления ядро полимерсомы дополнительно включает аммиак или его метилированный аналог, причем метилированным аналогом предпочтительно является TMA. В еще одном варианте осуществления полимерсома находится в композиции, включающей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый

эксципиент. В другом варианте осуществления композиция находится в жидкой, полутвердой или твердой форме.

В конкретном варианте осуществления поддерживающая терапия представляет собой экстракорпоральную поддержку печени. Например, можно использовать устройство для экстракорпоральной поддержки печени, которое включает гепатоциты. В другом варианте осуществления можно осуществлять плазмообмен в дополнение к введению лекарственного средства, представленного в настоящей заявке. В еще одном варианте осуществления экстракорпоральная поддержка печени представляет собой замену альбумина или удаление эндотоксина.

Следующие примеры служат для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем.

## **ПРИМЕРЫ**

### **ПРИМЕР 1: NTZ индуцирует экспрессию глутаминсинтетазы, участвующей в детоксикации аммиака**

#### Доклиническая модель

Повреждение печени индуцировали у самцов мышей C57Bl/6 возраста 5-6 недель (Janvier Labs, Франция), выдерживая их на дополненной холестерином (1%) холин-дефицитной диете с L-аминокислотами (CDAA/c) (Ssniff, Германия) в течение 12 недель (n=12). Некоторые животные получали с 1-го дня и на протяжении всего исследования диету CDAA/c с добавлением NTZ (Interchim, Франция) (100 мг/кг/день) (n=8). Мыши, которых выдерживали на диете с L-аминокислотами с добавлением холина (CSAA), служили в качестве дополнительных контролей (n=6).

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных.

#### Транскриптомный анализ

Тотальную РНК выделяли из печени мышей с использованием набора РНК Nucleospin® 96 (Ref 740709.4, Macherey Nagel, Франция) (n=5). После измерения концентрации образцов РНК на спектрофотометре Multiskan™ GO (Thermo Scientific, Франция) оценивали качество с использованием Биоанализатора 2100 от Agilent (США). Библиотеки получали с использованием набора Illumina TruSeq stranded mRNA LT (Ref RS-122-2101, Illumina, США), а мРНК секвенировали с использованием устройства NextSeq 500 (секвенирование спаренных концов, 2×75 п.н.) с проточной кюветой High Output (Ref FC-404-2002 - NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (150 циклов), Illumina, США).

Очистку данных осуществляли с использованием Trimmomatic v.0.36 со следующими параметрами: SLIDINGWINDOW:5:20 LEADING:30 TRAILING:30 MINLEN:60 (Bolger et al., Bioinformatics, 2014). Затем данные были выровнены по референсному геному (*Mus musculus* GRCm38.90 - GenBank assembly accession GCA\_000001635.2) с коктейлем из РНК с использованием hisat2 v.2.1.0 в качестве



выравнивателя с параметрами по умолчанию (Sahraeian et al. Nature communications 2017).

Таблица подсчета была получена с использованием featureCounts v1.5.3 с параметрами по умолчанию (Liao Y et al. Bioinformatics 2014).

Для идентификации дифференциально экспрессируемых генов (DE гены) использовали R (версия 3.4.3) и DESeq2 библиотеку (версия 1.18.1). Аннотации генов были получены с использованием библиотеки AnnotationDbi (версия 1.40.0). Вкратце, матрица подсчета, созданная FeatureCounts, была проанализирована с использованием функции DESeqDataSetFromMatrix(), а затем функции DESeq() из библиотеки DESeq2. Для каждого условия (т.е. сравнения NTZ+CDATA/cvs CDATA/c) кратное изменение и р-значение были получены с использованием функции results() из DESeq2.

#### Результаты

Анализ дифференциально экспрессируемых генов в печеночном транскриптоме мышей, получавших NTZ, по сравнению с мышами, получавшими только диету CDAA/c, показал, что экспрессия мРНК Glul значительно дифференцирована (Таблица 1).

**ТАБЛИЦА 1**

**Топ-10 наиболее значимых генов, на которые влияет воздействие NTZ**

Ранг	Символ	Средн. уровень экспрессии	Кратное изменение (log2)	Скорректированное р-значение	Название гена
1	Gsta2	4272	1,652	7,42E-24	Глутатион S-трансфераза, альфа 2 (Yc2)
2	Abcc4	1873	1,354	3,03E-17	АТФ-связывающая кассета, субсемейство С (CFTR/MRP), член 4
3	Prodh	10649	0,756	1,46E-15	Пролиндегидрогеназа
4	Slc1a2	18107	0,820	8,57E-15	Семейство транспортеров растворенных веществ 1 (глиальный высокоаффинный транспортер глутамата), член 2
5	Ldhd	14329	0,659	1,35E-14	Лактатдегидрогеназа D
6	Ctsk	911	-0,930	8,09E-14	Катепсин К
<b>7</b>	<b>Glul</b>	<b>105162</b>	<b>0,672</b>	<b>2,61E-13</b>	<b>Глутамат-аммиак лигаза (глутаминсинтетаза)</b>
8	Abat	21598	0,792	1,84E-12	4-аминобутират аминотрансфераза
9	Sugct	3484	0,664	3,14E-12	Сукцинил-СоА глутарат-СоА трансфераза
10	Arhgef26	2664	1,108	4,46E-12	Rho фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) 26

Ранг: все дифференциально экспрессируемые гены были отсортированы в соответствии с их скорректированным р-значением.

Кратное изменение: NTZ+CDAA/c по сравнению с CDAA/c в log2

Скорректированное р-значение: р-значение кратного изменения, скорректированное на множественное тестирование

Glul кодирует фермент глутаминсинтетазу, участвующий в детоксикации аммиака в печени (Zhou et al. *Neurochemistry International* 2020), молекулы, которая, как известно, вызывает гепатоцеллюлярное повреждение и фиброз печени. Базальный уровень экспрессии Glul очень высок в печени мышей (в среднем 105162 единиц, таблица 1), и его экспрессия снижается на 40% при использовании диеты CDAA/c по сравнению с CSAA контролями (скорректированное значение  $p=7 \times 10^{-10}$ ). NTZ надежно восстанавливает базальную экспрессию Glul, индуцируя ее 1,6-кратное увеличение у мышей, получавших CDAA/c (скорректированное значение  $p=2,6 \times 10^{-13}$ ).

Таким образом, эти данные показывают важную роль NTZ в предотвращении гепатоцеллюлярного повреждения путем стимуляции детоксикации аммиака за счет продукции глутамина.

### **ПРИМЕР 2: NTZ защищает гепатоциты от аммиак-индуцированной токсичности**

У пациентов с острыми или хроническими заболеваниями печени часто наблюдается гипераммониемия из-за нарушений метаболизма аммиака и детоксикации. Это накопление аммиака, в свою очередь, вызывает гепатоцеллюлярные повреждения, образование рубцовой ткани (фиброз) и ускоряет прогрессирование заболевания.

Чтобы оценить эффект NTZ на гепатоциты человека, которые подвергаются клеточному стрессу, индуцированному аммиаком, клеточную линию HepG2, происходящую из гепатобластомы человека (№ 85011430, ECACC, Великобритания), культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 1% пенициллина/стрептомицина, 1% пирувата натрия, 1% L-глутамина и 1% заменимых аминокислот MEM (Gibco, Франция), в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Для оценки устойчивости клеток к хлориду аммония (NH<sub>4</sub>Cl) 1×10<sup>5</sup> клеток высевали в 96-луночный планшет с дозой в диапазоне 0-5 мкМ NTZ в той же среде для культивирования клеток. После прикрепления клеток (10 часов) клетки промывали PBS и инкубировали в присутствии 0, 60 или 120 мМ NH<sub>4</sub>Cl (Fluka, Франция) в среде DMEM без L-глутамина и FBS в течение 14 часов.

Цитотоксичность измеряли с использованием анализа CytoTox-Glow™ (#G9291, Promega, США). Вкратце, добавляли по 100 мкл реагента на лунку и планшеты инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Анализ CytoTox-Glow™ представляет собой люминесцентный анализ цитотоксичности, который измеряет относительное количество мертвых клеток в клеточных популяциях. Люминесценцию измеряли с использованием устройства для считывания микропланшетов Spark (#30086376, Tecan, США). Количество люминесценции (RLU) прямо коррелирует с процентом клеток, подвергающихся цитотоксическому стрессу.

Результаты представлены на Фиг. 1.

NH<sub>4</sub>Cl индуцировал высокую смертность в HepG2 как при низкой, так и при высокой концентрации NH<sub>4</sub>Cl (18-кратное и 23-кратное увеличение при 60 мМ и 120 мМ,

соответственно). Более того, NTZ снижал уровень смертности дозозависимым образом в двух условиях концентраций  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Фиг. 1). Эти результаты показывают, что NTZ оказывает прямое защитное действие на клетки печени.

### **ПРИМЕР 3: NTZ улучшает функции печени у крыс с циррозом**

#### Доклиническая модель цирроза

Самцам крыс Sprague Dawley (250-275 г) (Janvier, Франция) вводили интраперитонеально тиацетамид (ТАА) (ref 163678, Sigma) два раза в неделю в дозе 150 мг/кг в течение первой недели, а затем в дозе 200 мг/кг в течение 11 недель, чтобы вызвать цирроз печени (общая фаза индукции 12 недель). Крыс распределяли по группам лечения на основе среднего уровня альфа-2-макроглобулина в плазме (маркер фиброза) и общего билирубина в плазме (маркер функции печени), полученных из сублингвально взятых проб крови. Затем крысы получали стандартную диету (n=12) или диету с добавлением NTZ в дозе 30 мг/кг/день (n=10) в течение 4-недельной фазы вмешательства. Крысы, получавшие интраперитонеальные инъекции NaCl в течение 16 недель, служили в качестве дополнительных здоровых контролей (n=10).

Животных содержали парами в клетках с 12:12-часовым циклом свет-темнота, в помещении для животных с контролируемой средой, со свободным доступом к пище и воде. Массу тела и потребление пищи контролировали два раза в неделю.

В последний день лечения образцы плазмы получали из сублингвально взятых проб крови и крыс умерщвляли после 6-часового голодания. Печень быстро вырезали для биохимического и гистологического анализов.

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных.

#### Заливка тканей и секционирование

Срезы печени предварительно фиксировали в течение 12-24 часов в 4% растворе формалина (Merck Sigma, Франция). Затем кусочки печени обезвоживали в растворах этанола (последовательные ванны с 70 и 100% этанолом). Кусочки печени инкубировали в изопропанолем с последующими двумя ваннами в жидком парафине (60°C). Затем кусочки печени помещали в штативы (ref 11670990, Fisher Scientific, США) и заполняли Histowax® (ref F/00403, Microm, Франция) до полного покрытия ткани. Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, удаляли из штативов и хранили при комнатной температуре. Блоки печени разрезали на срезы толщиной 3 мкм.

#### Окраска пикросириусом красным

Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в течение 15 минут в 0,04% растворе прочного зеленого (Sigma, cat# F7258-25G). Затем срезы печени промывали 0,5% раствором уксусной кислоты и инкубировали 30 минут в 0,1% растворе пикросириуса красного (прямой красный, Alfa Aesar, Germany, cat# B21693-25G и раствор пикриновой кислоты, Sigma, cat# P6744) - 0,04% растворе прочного зеленого. Срезы обезвоживали и подготавливали для исследования с использованием среды CV Mount

(Leica, USA, cat# 14046430011). Соответствующую площадь коллагена оценивали путем морфометрического количественного определения пикросириус-положительной области относительно площади среза печени.

#### Гистологические исследования

Виртуальные слайды были созданы с использованием сканера Pannoramic 250 компании 3D Histech (Венгрия). Для каждого животного оценку фиброза определяли на срезах, окрашенных пикросириусом красным и прочным зеленым, на основании классификации фиброза по стадиям в соответствии с локализацией депо коллагена и патологическим паттерном структуры печени, что давало представление об относительной тяжести и прогрессировании болезни. F0: отсутствие фиброза, F1: перисинусоидальный или перипортальный фиброз, F2: перисинусоидальный и портальный/перипортальный фиброз. F3: мостовидный фиброз. F4: цирроз.

#### Анализы плазмы

Концентрацию макроглобулина альфа-2 в плазме определяли методом ELISA с использованием набора Abscam (cat# ab157730, Великобритания). Интенсивность окраски, измеренная при 450 нм, пропорциональна количеству a2M, связанного на начальной стадии. Затем выборочные значения выводятся из стандартной кривой. Результаты выражены в нг/мл.

Концентрацию общего билирубина измеряли с использованием набора Randox для автоматизированного анализатора Daytona plus (Randox, cat# BR 8377). Вкратце, билирубин окисляется ванадатом при pH около 2,9 с образованием биливердина. В присутствии детергента и ванадата окисляется как конъюгированный, так и неконъюгированный билирубин. Эта реакция окисления вызывает снижение оптической плотности желтого цвета, характерного для билирубина. Снижение оптической плотности при 450/546 нм пропорционально концентрации общего билирубина в образце.

Концентрацию альбумина измеряли с использованием набора Randox для автоматизированного анализатора Daytona plus (Randox, cat# AB 8301). Вкратце, измерение альбумина основано на его количественном связывании с индикатором 3,3',5,5'-тетрабром-м-крезолсульфонфталеином (бромкрезоловый зеленый). Комплекс альбумин-BCG максимально поглощает при 578 нм.

#### Результаты

16-недельное введение ТАА индуцировало цирроз печени у крыс, о чем свидетельствует гистологическая оценка F4 у всех животных (Фиг. 2).

Билирубин является результатом катаболизма гема (в основном из гемоглобина в эритроцитах). Печень отвечает за очистку крови от билирубина. Высокий уровень общего билирубина в плазме является маркером нарушения функции печени. Как и ожидалось, общий билирубин плазмы повышался после 16 недель введения ТАА. Лечение препаратом NTZ резко снижало общий билирубин плазмы (Фиг. 3).

Альбумин синтезируется в печени. При любом заболевании печени падение уровня альбумина в плазме отражает снижение синтезирующей функции. Как и ожидалось,

уровень альбумина в плазме снижался после 16 недель введения ТАА, но восстанавливался при лечении препаратом NTZ (Фиг. 4).

Интересно, что эти благоприятные эффекты на функции печени не зависели от фиброза, так как это 4-недельное интервенционное лечение с использованием NTZ было слишком коротким, чтобы наблюдать значительный эффект на фиброз печени (доля площади коллагена при использовании NTZ  $7,53 \pm 0,64\%$  по сравнению с  $7,74 \pm 0,38\%$  в ТАА контрольной группе,  $p=0,77$ ). Многофакторный анализ подтвердил независимый эффект NTZ на функции печени (билирубин или альбумин), с одной стороны, и на фиброз, с другой.

В совокупности эти результаты показывают, что NTZ оказывает защитное действие на детоксикационную и синтезирующую функции печени независимо от его антифибротического эффекта у животных, страдающих циррозом.

#### **ПРИМЕР 4: NTZ предотвращает декомпенсацию в модели острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF)**

##### Доклиническая модель ACLF

Самцам крыс Sprague Dawley (175-200 г) (Janvier Labs, Франция) вводили интраперитонеально тиоацетамид (ТАА) 3 раза в неделю в дозе 150 мг/кг в течение первой недели, а затем в дозе 200 мг/кг в течение 14 недель для индукции цирроза. Крыс разделяли на группы обработки ( $n=5$  на группу) на основании средних уровней маркеров фиброза в плазме (альфа-2 макроглобулина и ингибитора металлопептидазы 1 (TIMP1)) и тестов функции печени (общий уровень желчных кислот и уровень альбумина в плазме), определенных их сублингвально взятых проб крови.

Животных содержали парами в клетках с 12:12-часовым циклом свет-темнота в помещении для животных с контролируемой средой, со свободным доступом к пище и воде. Массу тела и потребление пищи контролировали два раза в неделю.

После индукции цирроза крысы получали однократную интраперитонеальную инъекцию 0,05 мг/кг липополисахарида (LPS из *Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich) для индукции ACLF через одну неделю после прекращения введения ТАА. Крысам вводили NTZ перорально через желудочный зонд в дозе 50 мг/кг/день два раза в день или носитель в течение 3 дней с последующей последней дозой за 30 минут до индукции ACLF (Фиг. 5). Плазму получали из сублингвально взятых проб крови непосредственно перед умерщвлением.

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных.

##### Анализ плазмы

Как описано в ПРИМЕРЕ 3, концентрацию альфа-2-макроглобулина в плазме определяли методом ELISA с использованием набора Abcam (cat# ab157730), а концентрацию альбумина измеряли с использованием набора Randox для автоматизированного анализатора Daytona plus (Randox, cat# AB 8301).

Общую концентрацию желчных кислот измеряли с использованием соответствующего набора Randox для автоматизированного анализатора Daytona plus (Randox, cat# BI 3863). В присутствии Thio-NAD фермент 3-альфа-гидроксистероиддегидрогеназа (3-а HSD) превращает желчные кислоты в 3-кетостероиды и Thio-NADH. Реакция обратима, и 3-а HSD может превращать 3-кетостероиды и Thio-NADH в желчные кислоты и Thio-NAD. В присутствии избытка NADH ферментативный цикл протекает эффективно, и скорость образования Thio-NADH определяют путем измерения специфического изменения поглощения при 405 нм.

Уровни TIMP-1 в плазме измеряли с использованием количественного сэндвич-анализа ELISA от R&D Systems (cat# RTM100). Затем выборочные значения рассчитываются из стандартной кривой.

#### Результаты

Введение LPS крысам с циррозом вызывало печеночную недостаточность и смертность в течение 24 часов. В этом эксперименте лечение препаратом NTZ замедляло время до смерти на 1 час и позволяло выжить 1 крысе из 5, тогда как все животные в группе, получавшей носитель, умерли в течение 8 часов (Фиг. 6). Кроме того, NTZ снижал уровень циркулирующих желчных кислот, что свидетельствует об улучшении функции печени (Фиг. 7). Таким образом, эти результаты показывают, что кратковременное введение NTZ улучшает функции печени и защищает от декомпенсации в модели печеночной недостаточности.

#### **ПРИМЕР 5: NTZ уменьшает отек головного мозга в модели грызунов с ACLF, индуцированной перевязкой желчных протоков и инъекцией LPS.**

Острая печеночная недостаточность на фоне хронической характеризуется ухудшением состояния органов помимо острой декомпенсации печени. В этом исследовании изучали эффект NTZ на отек головного мозга в модели ACLF, индуцированной у крыс перевязкой желчных протоков (BDL) - индукцией повреждения печени и выраженного фиброза через 3 недели - и введением липополисахарида (LPS).

Как описано Kountouras et al (British Journal of Experimental Pathology 1984), у крыс, перенесших BDL, через 22 дня после операции наблюдалось тяжелое повреждение печени с выраженным фиброзом и пролиферацией желчных протоков.

Операция BDL была проведена на 37 крысах Sprague Dawley с массой тела около 270 г в лаборатории Charles River (Франция). После анестезии изофлураном (Vetflurane, Alcyon, Франция) и нанесения на кожу 2% лидокаина (Alcyon) осуществляли срединную лапаротомию для обнажения печени и двенадцатиперстной кишки. Находили и выделяли общий желчный проток. После этого желчный проток перевязывали в двух частях: первую перевязку делали посередине желчного протока, а вторую перевязку - над устьем панкреатического протока. Затем желчный проток разрезали посередине, чтобы избежать реканализации.

Животным перед операцией вводили 0,05 мг/кг бупренорфина (Buprecare, Alcyon) и 5 мг/кг карпрофена (Carprofelican, Alcyon) и через 4 часа после операции вводили

бупренорфин в дозе 0,05 мг/кг, а затем вводили карпрофен в дозе 5 мг/кг через 24 и 48 часов после операции.

Животных переводили в виварий Genfit (Франция) после минимум 5 дней восстановления после операции. Через пятнадцать дней после операции брали образец крови из подъязычной вены под легкой анестезией изофлураном (Isoflurin, Axience, Франция) для измерения маркеров повреждения печени (сывороточная аспаратаминотрансфераза (AST) и щелочная фосфатаза (ALP)) для стратификации животных по группам обработки. Две BDL крысы были исключены на этом этапе из-за аномальных параметров крови, а 4 умерли или были умерщвлены по этическим причинам (при операции BDL ожидается ранняя смертность 10-20%). Неоперированные животные были включены в исследование как здоровые контроли.

Через 22 дня после операции BDL индуцировали острую декомпенсацию путем интраперитонеального введения 1 мкг/кг LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, Германия). Четыре крысы с BDL получали фосфатно-солевой буферный раствор (PBS, Fisher Scientific, США) вместо LPS, которых использовали в качестве BDL контролей. За каждым животным непрерывно наблюдали после инъекции LPS для оценки степени тяжести воспалительной реакции и боли. Инъекция LPS у этих крыс индуцировала сильную воспалительную реакцию, отчетливо видимую по изменению цвета ушей на красный.

NTZ 100 мг/кг (Interchim, Франция) или носитель (1% карбоксиметилцеллюлоза (C4888, Sigma-Aldrich), 0,1% твин-80 (P8074, Sigma-Aldrich)) вводили через зонд непосредственно перед инъекцией LPS.

Через три часа после инъекции LPS брали пробы крови из подъязычной вены и под легкой анестезией, как описано ранее, и животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Собирали печень, селезенку, почки и головной мозг.

Манипуляции с животными проводились осторожно, чтобы свести стресс к минимуму. Все эксперименты осуществляли в соответствии с рекомендациями Министерства сельского хозяйства Франции для экспериментов с лабораторными животными (закон 87-848). Исследование проводилось в соответствии с Положением о здоровье животных (директива Совета № 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г и закон Франции № 2013-118 от 1 февраля 2013 г. о защите животных).

Группа	Соединения	Животные/ группа	Примечания
Здоровые	нет	4	Неоперированный здоровый контроль
BDL+PBS	нет	4	Контроль фиброза печени завершался через 22 дня после BDL
BDL+LPS+носитель	нет	13	Контроль ACLF завершался через 22 дня после BDL и через 3 часа после LPS
BDL+LPS+NTZ	NTZ (100 мг/кг)	13	NTZ лечение завершалось через 22 дня после BDL

			и через 3 часа после LPS
--	--	--	--------------------------

Для оценки отека головного мозга свежий мозг взвешивали, дегидратировали путем нагревания в течение 4 часов и снова взвешивали для расчета процентного содержания воды.

#### Результаты

Повреждение печени было связано со значительным увеличением отека головного мозга, что оценивалось по проценту воды, содержащейся в мозге (Фиг. 8). Введение NTZ одновременно с инъекцией LPS заметно уменьшало количество воды в головном мозге. Таким образом, этот эксперимент демонстрирует, что NTZ можно использовать для лечения или предотвращения отека головного мозга.

#### **ПРИМЕР 6: NTZ улучшает функцию почек в модели грызунов с ACLF, индуцированной перевязкой желчных протоков и инъекцией LPS**

В этом исследовании изучали эффект NTZ на маркеры функции почек в модели ACLF, индуцированной у крыс перевязкой желчных протоков (BDL) - индукцией повреждения печени и выраженного фиброза через 3 недели - и введением липополисахарида (LPS).

#### Материалы и методы

Операцию BDL у крыс и острую декомпенсацию осуществляли, как в предыдущем примере.

Группа	Соединения	Животные/ группа	Примечания
Здоровые	нет	4	Неоперированный здоровый контроль
BDL+PBS	нет	4	Контроль фиброза печени завершался через 22 дня после BDL
BDL+LPS+ носитель	нет	13	Контроль ACLF завершался через 22 дня после BDL и через 3 часа после LPS
BDL+LPS+NTZ	NTZ (100 мг/кг)	13	NTZ лечение завершалось через 22 дня после BDL и через 3 часа после LPS

Повреждение почек оценивали по концентрации цистатина С в сыворотке, определяемой методом ELISA (иммуноанализ на цистатин С для мышей/крыс Quantikine® ELISA, MSCTC0, R&D Systems).

#### Результаты

Инъекция LPS вызывала изменение функции почек, о чем свидетельствует повышение уровня цистатина С в сыворотке (Фиг. 9). Лечение препаратом NTZ резко снижало цистатин С почти до уровня здоровых контролей. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют способность NTZ улучшать повреждение периферических органов (в частности, головного мозга и почек) при ACLF.

#### **ПРИМЕР 7: NTZ уменьшает повреждение печени при ацетинофен-индуцированной острой печеночной недостаточности**

Острую печеночную недостаточность индуцировали введением мышам



токсической дозы ацетаминофена (АРАР). После 5-дневного периода акклиматизации 8-недельных самцов мышей C57BL/6J (Janvier, Франция) разделяли на 3 группы по 10 мышей в зависимости от их массы тела. Все мыши голодали в течение ночи перед введением 300 мг/кг АРАР путем интраперитонеальной инъекции. За 30 минут до интоксикации АРАР мышам внутривентрикулярно вводили носитель (1% карбоксиметилцеллюлоза (С4888, Sigma-Aldrich), 0,1% твин-80 (P8074, Sigma-Aldrich)), 50 мг/кг NTZ (Interchim, Франция) или 1200 мг/кг N-ацетилцистеина (НАС), эталонное лечение интоксикации АРАР. Мыши имели свободный доступ к пище и воде сразу после инъекции АРАР.

Через шесть часов после инъекции АРАР у всех мышей собирали кровь в пробирку с гепарином путем пункции ретроорбитального синуса под анестезией. Повреждение печени оценивали по аспартатаминотрансферазе (АСТ) в плазме, определяемой с использованием аппарата Horiba Pentra 400 и соответствующего набора для анализа Pentra (Horiba France SAS, Франция). Животных умерщвляли через 24 часа после введения АРАР путем цервикальной дислокации, обескровливали с использованием физиологического раствора, образцы печени собирали и взвешивали.

Манипуляции с животными проводились осторожно, чтобы свести стресс к минимуму. Все эксперименты осуществляли в соответствии с рекомендациями Министерства сельского хозяйства Франции для экспериментов с лабораторными животными (закон 87-848). Исследование проводилось в соответствии с Положением о здоровье животных (директива Совета № 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г и закон Франции № 2013-118 от 1 февраля 2013 г. о защите животных).

### Результаты

Результаты показывают, что интоксикация АРАР вызывала резкое увеличение АСТ в плазме (>6000 Ед/л по сравнению с <100 Ед/л у здоровых мышей). Удивительно, но лечение NTZ значительно снижало АСТ до уровня, аналогичного уровню при применении НАС, эталонного лечения интоксикации АРАР (Фиг. 10). Эти результаты показывают способность NTZ лечить пациентов с лекарственной острой печеночной недостаточностью (ALF).

### **ПРИМЕР 8: NTZ улучшает маркеры почечной функции**

Декомпенсация цирроза часто связана с нарушением функции почек. В этом исследовании изучали эффект NTZ на предотвращение повреждения почек в модели острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF). Вкратце, ACLF индуцировали инъекцией липополисахарида (LPS) у крыс с выраженным фиброзом/циррозом печени, индуцированным регулярным введением тетрахлорида углерода (CCl<sub>4</sub>) в течение 15 недель.

Протокол исследования включал 4 фазы:

1) Фаза предварительной сенсбилизации: фенобарбитал (P5178, Sigma Aldrich) добавляли в питьевую воду (35 г/дл) для 32 4-недельных самцов крыс Sprague-Dawley (~200 г, Janvier Lab) в течение 2 недель, чтобы активировать ферменты цитохрома,

которые метаболизируют  $\text{CCl}_4$ .

2) Индукция фиброза печени: хронические поражения печени индуцировали регулярными (два раза в неделю) пероральными введениями  $\text{CCl}_4$  (ref: 289116, Sigma Aldrich; разбавленный в оливковом масле) (возрастающие дозы, начиная с 0,10 мл/кг, добавляя 0,05-0,10 мл /кг при каждом введении до достижения 0,85 мл/кг через 7 недель и далее) вплоть до 15 недель со следующими окончательными дозами:

Неделя 1	0,10 мл/кг 0,20 мл/кг
Неделя 2	0,25 мл/кг 0,30 мл/кг
Неделя 3	0,35 мл/кг 0,40 мл/кг
Неделя 4	0,45 мл/кг 0,50 мл/кг
Неделя 5	0,60 мл/кг 0,70 мл/кг
Неделя 6	0,80 мл/кг 0,85 мл/кг
Неделя 7 и далее	0,85 мл/кг

3) Фаза лечения: после 15 недель введения  $\text{CCl}_4$  введение  $\text{CCl}_4$  через зонд прекращали за одну неделю до введения LPS. Носитель (1% карбоксиметилцеллюлоза (C4888, Sigma-Aldrich), 0,1% твин-80 (P8074, Sigma-Aldrich)) или NTZ (50 мг/кг два раза в сутки) вводили перорально в течение 3 дней до введения LPS. Последнюю дозу (50 мг/кг) либо носителя, либо NTZ вводили за 30 минут непосредственно перед введением LPS.

4) Введение LPS: LPS из *Escherichia coli* O111:B4 (L2630, Sigma Aldrich) вводили интраперитонеально в дозе 0,03 мг/кг.

Группа	Соединения	Животные/ группа	Примечания
Оливковое масло W10	нет	6	Непатологический контроль, завершившийся на Неделе 10
$\text{CCl}_4$ W10	нет	12	Контроль фиброза печени, завершившийся на Неделе 10
ACLF- носитель	нет	10	Введение LPS после 15-недельного введения $\text{CCl}_4$
ACLF-NTZ	NTZ (50 мг/кг VID)	10	Введение LPS после 15-недельного введения $\text{CCl}_4$

В течение первых часов после введения LPS за каждым животным непрерывно наблюдали для оценки степени выраженности воспалительной реакции и боли. Следили за внешним видом животного (изменение шерсти, окраски кожи), степенью активности и бдительности (реакция на раздражитель, открывание век, активность...), походкой и

позой. Любое животное, показывающее явные признаки страдания и близкое к смерти, подвергалось эвтаназии. Как в группах с NTZ, так и в группах с носителем 6 животных из 10 выжили после инъекции LPS. Всех выживших животных подвергали эвтаназии через 24 часа после введения LPS для анализа плазмы и тканей. Все процедуры с животными выполняли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных.

Поражение почек оценивали по концентрации креатинина, мочевины и цистатина С в плазме. Концентрации креатинина и мочевины в плазме измеряли с использованием соответствующих наборов Randox (CR 8316, UR 8334, соответственно) для автоматизированного анализатора Daytona plus (Randox, cat# BR 8377) в соответствии с инструкциями изготовителя. Концентрацию цистатина С в плазме определяли методом ELISA (иммуноанализ на цистатин С для мышей/крыс Quantikine® ELISA, MSCTC0, R&D Systems).

Результаты показывают, что инъекция LPS после 15 недель введения CCl<sub>4</sub> ухудшает функцию почек, о чем свидетельствует увеличение концентрации креатинина, мочевины и цистатина С в плазме (Фиг. 11). Лечение с использованием NTZ замечательно предотвращает повреждение почек, восстанавливая уровни креатинина, мочевины и цистатина С до уровней контролей, которые получали оливковое масло.

#### **ПРИМЕР 9: Оценка эффективности NTZ при CCl<sub>4</sub>+LPS-индуцированной острой печеночной недостаточности на фоне хронической у крыс**

Цель исследования состояла в том, чтобы оценить эффективность NTZ для предотвращения LPS-индуцированных повреждений печени и почек у крыс Sprague-Dawley с CCl<sub>4</sub>-индуцированным тяжелым фиброзом.

Это исследование включало 4 фазы:

1) Фаза предварительной сенсibilизации: фенобарбитал (35 г/дл) (ref P5178-25G, Sigma-Aldrich) добавляли в питьевую воду для 4-недельных самцов крыс Sprague-Dawley (~200 г) в течение 2 недель до введения CCl<sub>4</sub>

2) Фаза индукции: тяжелый фиброз печени индуцировали регулярными пероральными введениями тетрахлорида углерода (CCl<sub>4</sub>) (два раза в неделю, увеличивая дозы с 0,10 до 0,85 мл/кг, два раза в неделю) в течение 10 или 15 недель по тому же протоколу, как описано в примере 8.

3) Фаза лечения: после 15 недель введения CCl<sub>4</sub> введение через желудочный зонд прекращали за одну неделю до введения LPS. Носитель или NTZ (50 мг/кг два раза в день (BID)) вводили перорально в течение 3 дней перед индукцией ACLF. Последнюю дозу (50 мг/кг) вводили за 30 минут непосредственно перед индукцией ACLF.

4) Индукция ACLF: LPS вводили интраперитонеально при 0,03 мг/кг.

Для перорального введения порошок NTZ (ref RQ550, Interchim) растворяли в 1% СМС в воде (карбоксиметилцеллюлоза натрия, ref C48 88-500G, Sigma Aldrich), твин-80 0,1% в воде в концентрации 10 мг/мл в бутылки из темного стекла, гомогенизировали

политроном и обрабатывали ультразвуком в течение 10 секунд при мощности 10%. NTZ хранили при магнитном перемешивании до введения крысам в дозе 10 мл/кг и защищали от света.

Раствор LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, Германия) получали в боксе микробиологической безопасности и растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при 15 мкг/мл, разделяли на аликвоты и замораживали до дня проведения эксперимента. LPS вводили крысам в дозе 2 мл/кг.

Для исследования использовали 38 самцов крыс Sprague-Dawley (Janvier Labs, Франция).

Животные имели свободный доступ к воде и корму (ref E15000-04, Ssniff, Германия) на протяжении всего исследования. После 9 недель введения CCl<sub>4</sub> животных случайным образом распределяли на 2 группы в соответствии с уровнями аммиака и альбумина в плазме (чтобы иметь одинаковые средние значения в двух группах).

Всех выживших животных подвергали эвтаназии через 24 часа после инъекции LPS для анализа плазмы и тканей (60% выжили как в группе введения носителя, так и в группе NTZ). ACLF оценивали в конце исследования с использованием биохимического анализа повреждений печени и почек или функциональных биомаркеров.

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему уходу и использованию лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63UE.

Массу тела и потребление пищи контролировали два раза в неделю на протяжении всего исследования.

Во время фазы индукции фиброза каждое животное осматривали один раз в день для наблюдения за клиническими признаками. Наблюдения включают изменения кожи, шерсти, глаз, появление выделений и экскреции и вегетативную активность (слезотечение, пилоэрекция, необычный паттерн дыхания). Также отслеживали изменения походки, позы, стереотипов (например, чрезмерное вылизывание, повторяющиеся движения по кругу) или странное поведение (нанесение себе увечий, передвижение задом наперед...). Животных умерщвляли при потере массы тела более 25% в течение более 3 дней подряд, отказе от потребления пищи, ухудшении общего состояния или издавания звуков.

После введения LPS за каждым животным непрерывно наблюдали в течение 7 часов с целью оценки степени выраженности воспалительной реакции и боли. Оценку осуществляли в соответствии с оценочной таблицей, учитывающей внешний вид животного (изменение шерсти, цвета кожи), степень активности и настороженности (реакция на раздражитель, открывание век, активность...), походку и позу. Животных умерщвляли в случае ухудшения общего состояния животного (холодное на ощупь, неспособное встать, издавание звуков, одышка).

В конце исследования кровь собирали путем пункции подязычной вены под

легкой анестезией изофлураном и переносили в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA), сывороточным гелем и литий-гепарином. Пробирки с EDTA и литий-гепарином, содержащие кровь, быстро центрифугировали и собирали фракцию плазмы. Аликвоты плазмы из пробирок с литий-гепарином быстро замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , аликвоты плазмы из пробирок с EDTA хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а пробирки с сывороточным гелем хранили при комнатной температуре в течение 30 минут, центрифугировали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Затем животных умерщвляли путем цервикальной дислокации и обезглавливали для вырезания головного мозга и взвешивания. Собирали и взвешивали печень, селезенку и правую почку. Срез печени фиксировали и заливали в парафин для гистологического исследования. Оставшуюся печень быстро замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для биохимических анализов.

#### Обработка и анализы гистологических образцов:

Срезы печени сначала фиксировали в течение 10 или 24 часов (протокол уик-энда) в 4% растворе формалина (Merck Sigma). Затем кусочки печени дегидратировали в этанольных растворах (ванны с 70 и 100% этанолом). Кусочки печени инкубировали в двух ваннах с изопропанолом, а затем в двух ваннах с жидким парафином ( $60^{\circ}\text{C}$ ). Эти стадии осуществляли на LOGOS One (Milestone, MicromMicrotech). Затем кусочки печени помещали в штативы (Fisher Scientific, ref 11670990), которые осторожно заполняли Histowax® (Microm, ref F/00403) для полного покрытия ткани. Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, удаляли со штативов и хранили при комнатной температуре. Блоки печени разрезали на срезы толщиной 3 мкм на электронном ротационном микротоме HM340E (ThermoScientific, MicromMicrotech).

Окрашивание пикросириусом красным и прочным зеленым осуществляли на Autostainer ST5030 (Leica). Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в течение 15 минут в 0,04% растворе прочного зеленого (Sigma, cat# F7258-25G). Затем срезы печени промывали 0,5% раствором уксусной кислоты и инкубировали 30 минут в растворе пикросириуса красного 0,1% (прямой красный, Alfa Aesar, cat# B21693-25G и раствор пикриновой кислоты, Sigma, cat# P6744) - растворе прочного зеленого 0,04%. Срезы обезвоживали и подготавливали для исследования с использованием среды CV Mount (Leica, cat# 14046430011) на автоматическом приборе с покровным стеклом CV5030 (Leica). Гистологические исследования и оценку осуществляли вслепую для группы, получавшей лечение. Изображения получали с использованием цифрового сканера слайдов Pannoramic 250 Flash II (3DHitech) и анализировали с использованием программного обеспечения QuantCenter.

Следует отметить, что только животных (60%), которые выжили по прошествии 24 часов после LPS, можно было анализировать.

Результаты экспериментов выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение и представлены в виде гистограмм. Сравнение между группами было протестировано с использованием Т-критерия Стьюдента для всех переменных с

нормальным распределением (#:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ ; ###:  $p < 0,001$ ). Критерий Уэлча применяли в случае неравных дисперсий между группами ( $\alpha$ :  $p < 0,05$ ;  $\alpha\alpha$ :  $p < 0,01$ ;  $\alpha\alpha\alpha$ :  $p < 0,001$ ). Логарифмическое преобразование применяли к уровням ALT и AST в плазме во всех образцах для получения нормального распределения данных. Для других переменных с ненормальным распределением применялся непараметрический критерий Манна-Уитни ( $\$$ :  $p < 0,05$ ;  $\$\$$ :  $p < 0,01$ ;  $\$\$\$$ :  $p < 0,001$ ). О различиях с группой контроля (Ctrl) неделя 10 (W10) сообщается, если не указано иное.

### Результаты

Регулярно повторяющиеся введения  $\text{CCl}_4$  индуцировали тяжелый фиброз печени, характеризующийся F3 оценкой у большинства животных.

Индукция ACLF с использованием LPS привела к значительной смертности в течение 24 часов, составившей 40% как в группах, получавших носитель, так и в группах, получавших NTZ (4/10 крыс в обеих группах). Поражение печени и почек и функциональные маркеры оценивали у выживших животных через 24 часа после LPS. Уровни ALT и AST в плазме, маркеры гепатоцеллюлярного повреждения, значительно повышались при введении  $\text{CCl}_4$ , тогда как лечение с использованием NTZ значительно снижало ALT на 80% ( $p = 0,007$ ) и снижало AST на 87% ( $p = 0,005$ ) (Фиг. 14). Уровень GGT в плазме, еще одного маркера повреждения печени, не изменялся при введении  $\text{CCl}_4$  (не определялся), в то время как введение LPS повышало уровень GGT в плазме до 11,2 Ед/л (Фиг. 15). Лечение NTZ притупляло это LPS-индуцированное повышение GGT ( $< 6,15$  Ед/л).

Общий билирубин и альбумин в плазме - маркеры функции печени - также изменялись при введении  $\text{CCl}_4$  и LPS (Фиг. 16). Лечение NTZ предотвращало LPS-индуцированное изменение функции печени, о чем свидетельствует снижение общего билирубина на 80% ( $p = 0,02$ ) и восстановление продукции альбумина на 95% ( $p = 0,04$ ).

Инъекция LPS также изменяла функцию почек, о чем свидетельствуют повышенные концентрации в плазме креатинина, мочевины и цистатина С (Фиг. 17), подтверждая, что другие органы помимо печени поражаются в этой модели ACLF. Терапия NTZ также предотвращала LPS-индуцированную почечную недостаточность путем снижения уровня креатинина (-102%,  $p = 0,009$ ), мочевины (-92%,  $p = 0,002$ ) и цистатина С (-166%,  $p = 0,02$ ) в плазме.

Сывороточный IFN $\gamma$  измеряли у животных, получавших  $\text{CCl}_4$  в течение 15 недель и LPS, в то время как другие цитокины (IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) не могли быть обнаружены (не показано). Лечение с использованием NTZ значительно снижало IFN $\gamma$  в сыворотке на 56% ( $p = 0,04$ ), что подтверждает его противовоспалительное действие в модели ACLF (Фиг. 18).

### **Заключение**

У крыс с тяжелым фиброзом (F3/F4) 3-дневная предварительная обработка NTZ в дозе 100 мг/кг/день облегчает повреждение печени (ALT, AST, GGT) и предотвращает LPS-индуцированные изменения функций печени (общий билирубин, альбумин) и почек

(креатинин, мочеви́на, цистати́н С).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Соединение, выбранное из нитазоксанида (NTZ), тизоксанида (TZ), тизоксанида глюкуронида (TZG) и фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, для применения в способе лечения или профилактики печеночной недостаточности, выбранной из группы состоящей из острой печеночной недостаточности на фоне хронической (ACLF) и острой печеночной недостаточности (ALF), у нуждающегося в этом субъекта.
2. Соединение для применения по п. 1 в способе лечения или профилактики ACLF.
3. Соединение для применения по п. 1 или 2 в способе лечения ACLF.
4. Соединение для применения по любому из пп. 1-3 в способе предотвращения прогрессирования от компенсированного цирроза до декомпенсированного цирроза у субъекта с ACLF.
5. Соединение для применения по п. 1, где субъект имеет ACLF и компенсированный цирроз.
6. Соединение для применения по п. 1, где субъект имеет ACLF и декомпенсированный цирроз.
7. Соединение для применения по п. 1 в способе реверсии декомпенсированного цирроза в компенсированный цирроз у субъекта с ACLF.
8. Соединение для применения по любому из пп. 1-7, где субъект имеет ACLF степени 2 или 3.
9. Соединение для применения по любому из пп. 1-8, где у субъекта наблюдается по меньшей мере одно провоцирующее ACLF событие.
10. Соединение для применения по п. 9, где провоцирующее событие выбрано из алкогольного гепатита; бактериальной, грибковой или вирусной инфекции; сепсиса, отравления; висцерального кровотечения и лекарственно-индуцированной печеночной недостаточности.
11. Соединение для применения по любому из пп. 1-8, где субъект имеет ACLF в результате печеночного провоцирующего состояния или внепеченочного провоцирующего состояния.
12. Соединение для применения по любому из пп. 1-11 для применения в способе предотвращения декомпенсации печени у субъекта с ACLF.
13. Соединение для применения по п. 1 в способе лечения или профилактики ALF.
14. Соединение для применения по п. 13 в способе лечения или профилактики лекарственно-индуцированной ALF.
15. Соединение для применения по п. 14 в способе лечения или профилактики ацетаминофен-индуцированной ALF.
16. Соединение, выбранное из нитазоксанида (NTZ), TZ(G) и фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, для применения в способе предотвращения внепеченочной органной недостаточности у субъекта с циррозом печени.
17. Соединение по п. 16, где субъект имеет компенсированный или



декомпенсированный цирроз.

18. Соединение по п. 16 или 17, где субъект имеет декомпенсированный цирроз.

19. Соединение для применения по любому из пп. 16-18, где субъект имеет алкогольный цирроз.

20. Соединение для применения по любому из пп. 16-19, где способ предназначен для профилактики почечной недостаточности.

21. Соединение для применения по любому из пп. 16-20, где субъект имеет ACLF без почечной недостаточности.

22. Соединение для применения по любому из пп. 16-20, где субъект имеет ACLF с органной недостаточностью, не связанной с почками, и с дисфункцией почек.

23. Соединение для применения по любому из пп. 1-22 для дальнейшего предотвращения печеночной энцефалопатии.

24. Соединение для применения по любому из пп. 1-23 для дальнейшего лечения или предотвращения отека головного мозга.

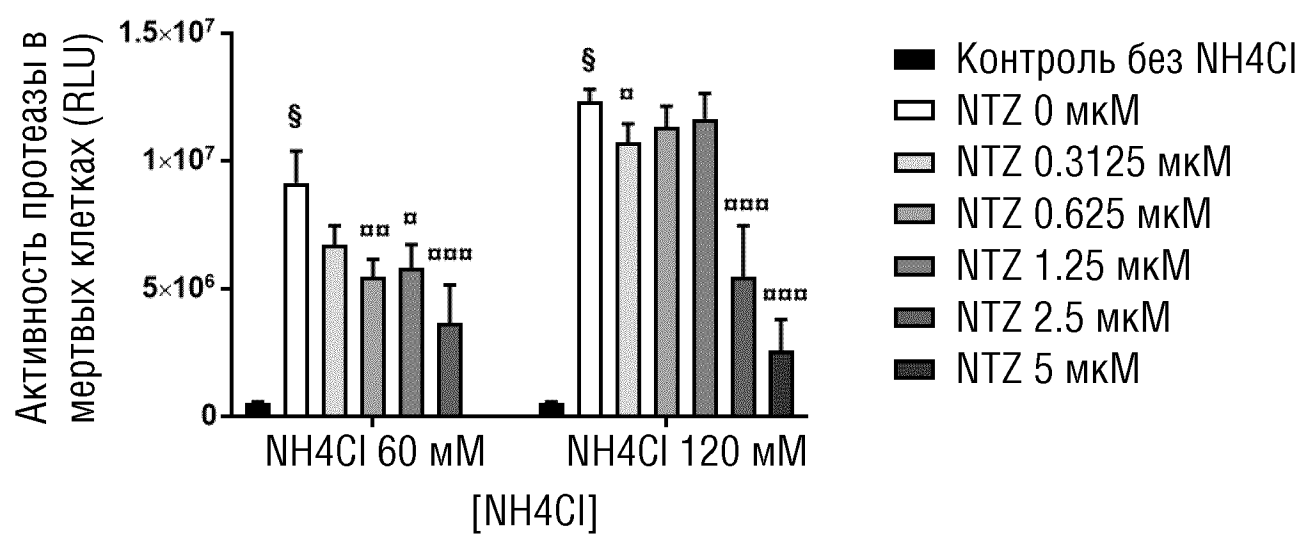
25. Соединение для применения по любому из пп. 1-24 для дальнейшего предотвращения отека головного мозга.

26. Соединение для применения по любому из пп. 1-25 для применения в комбинации с поглотителем токсинов на основе липосом.

27. Соединение для применения по п. 26, где поглотитель токсинов на основе липосом представляет собой поглотитель аммония.

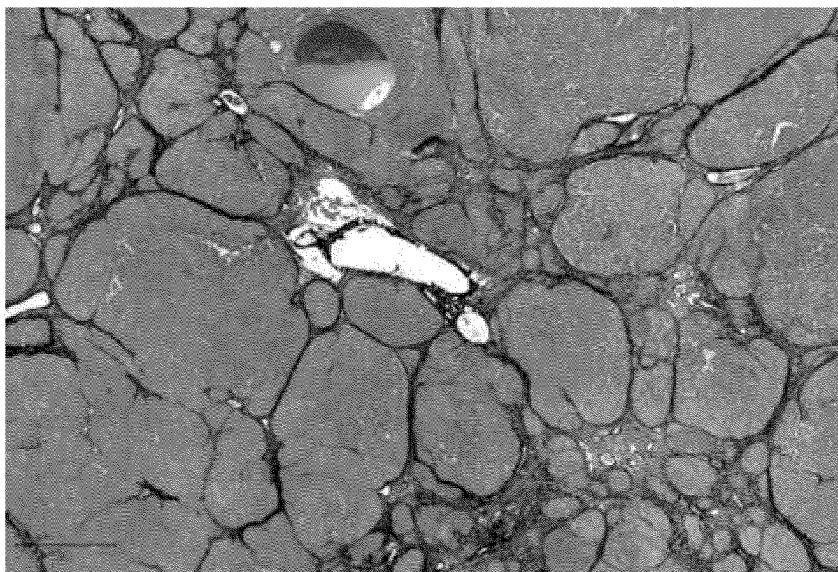
28. Соединение для применения по п. 26 или 27, где поглотитель токсинов на основе липосом предназначен для доставки в брюшную полость.

ФИГ.1

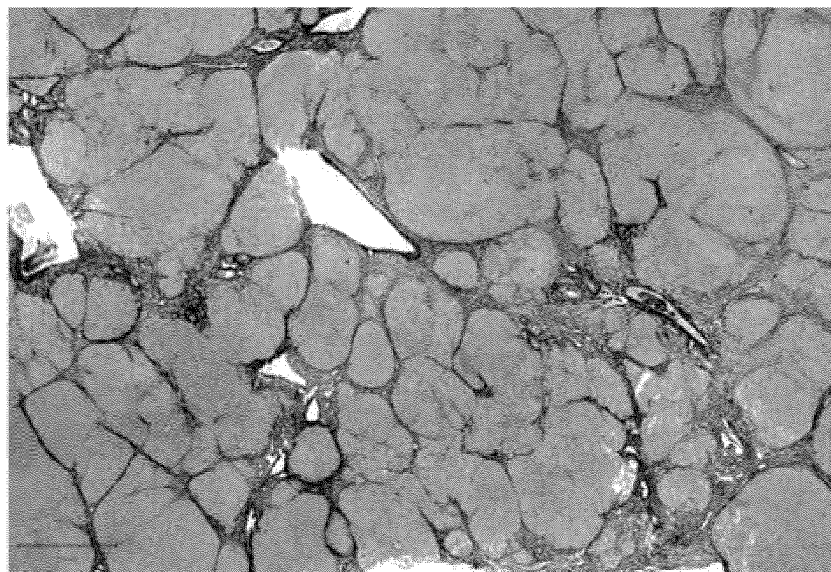


ФИГ.2

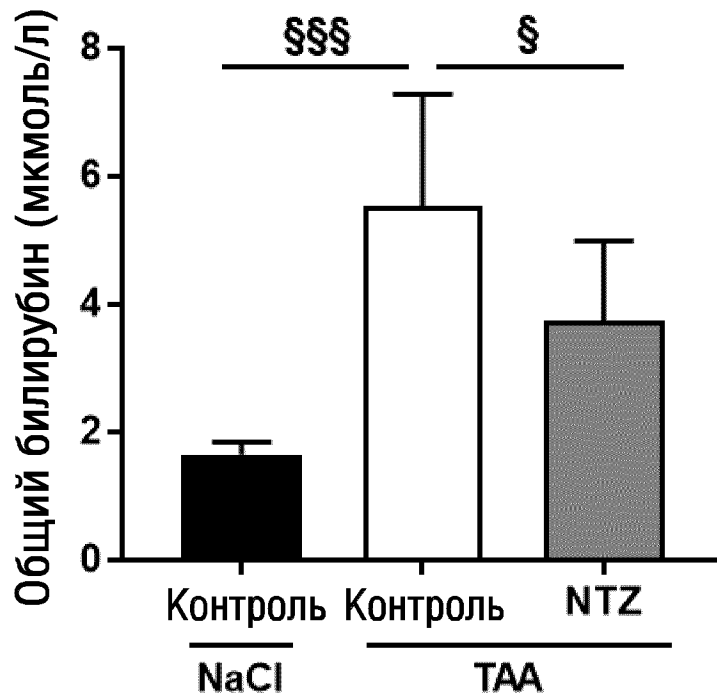
Контроль ТАА



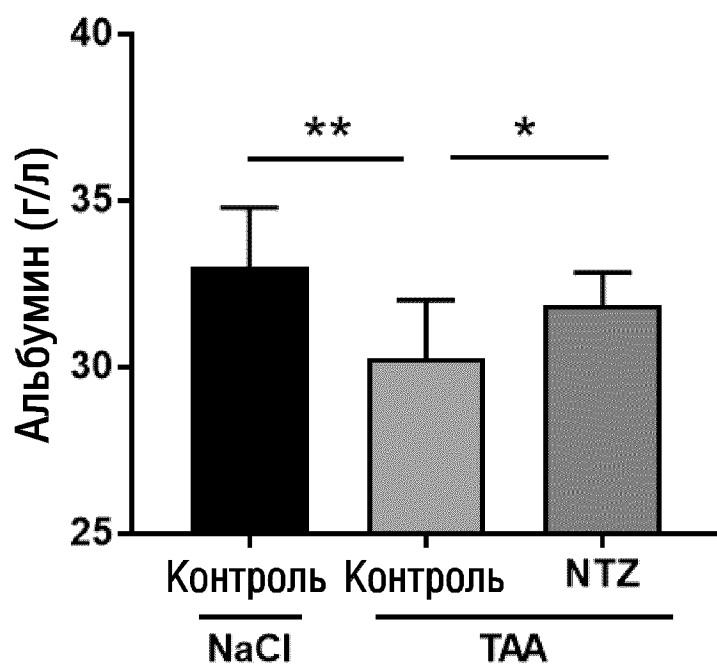
NTZ



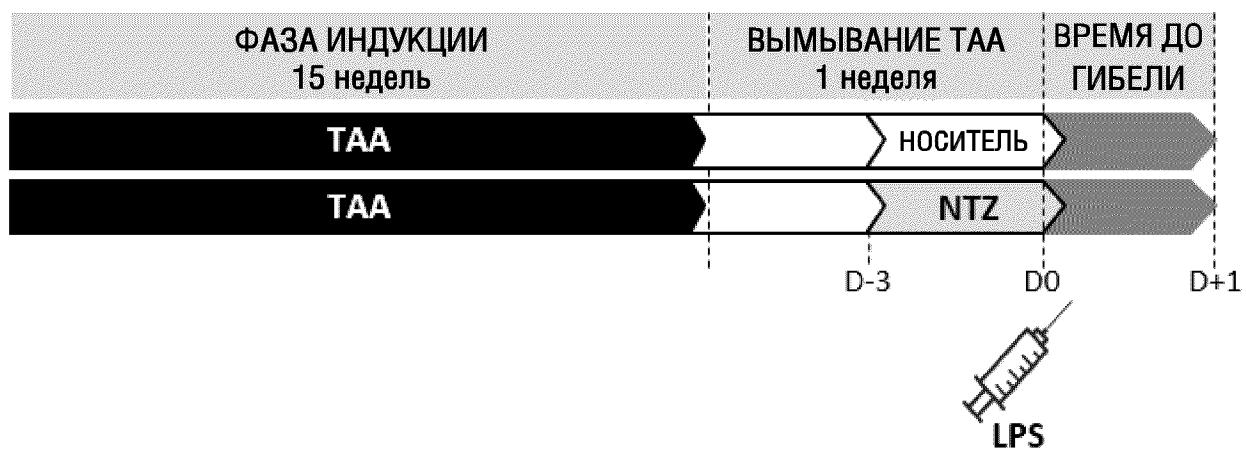
ФИГ.3



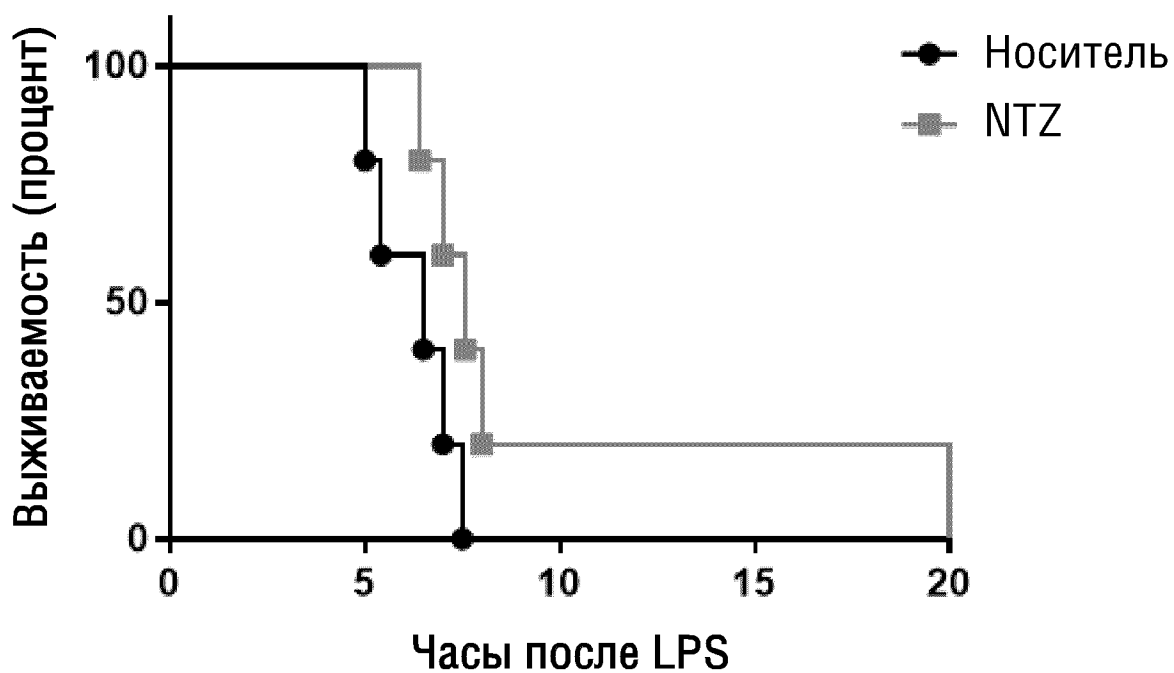
ФИГ.4



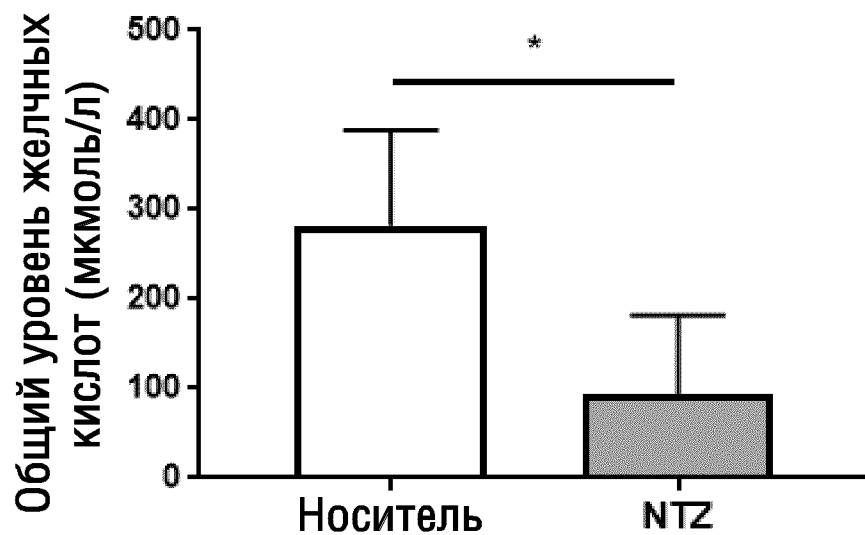
ФИГ.5



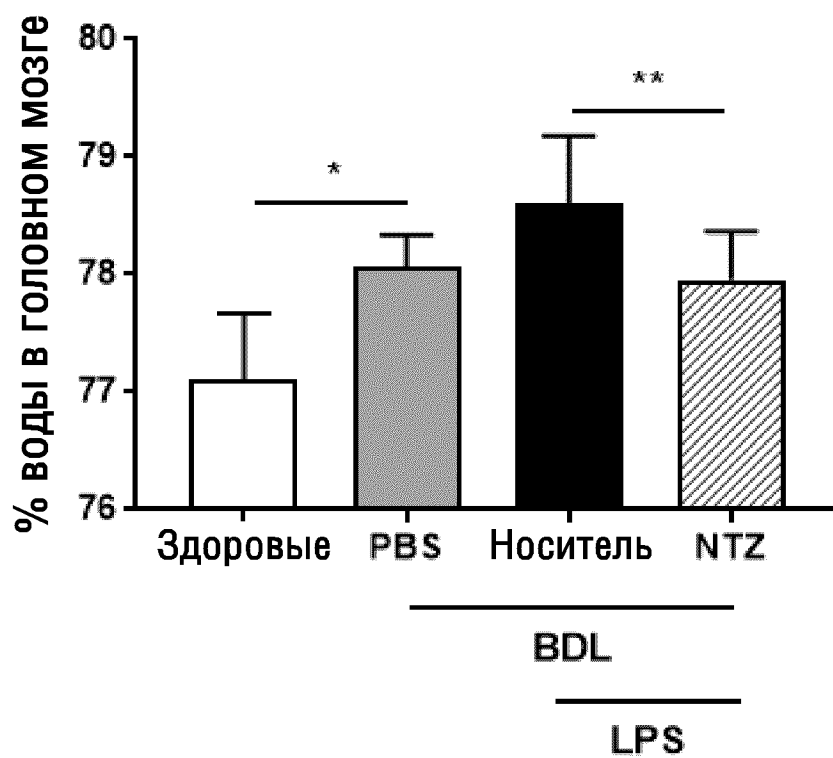
ФИГ.6



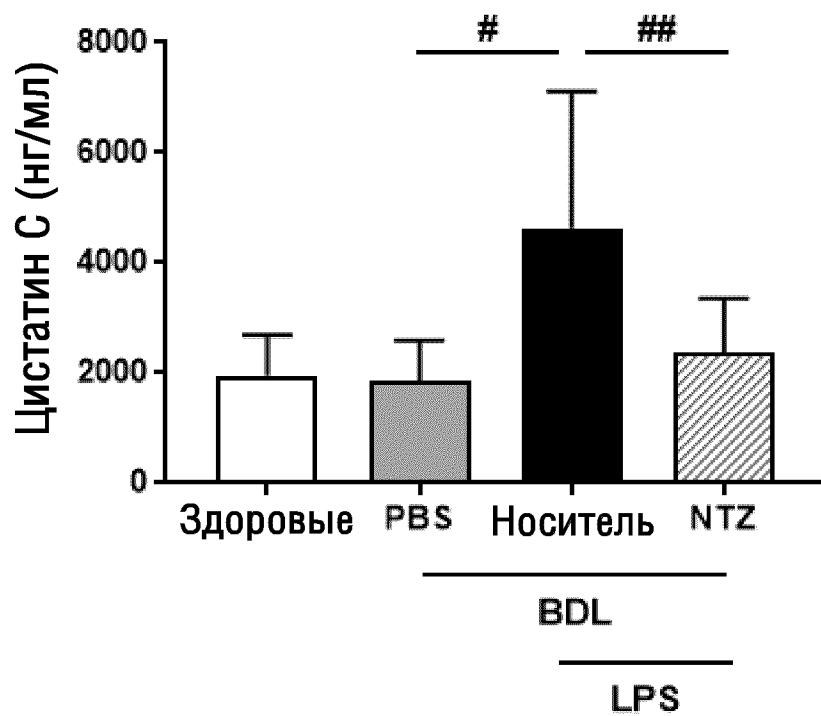
ФИГ.7



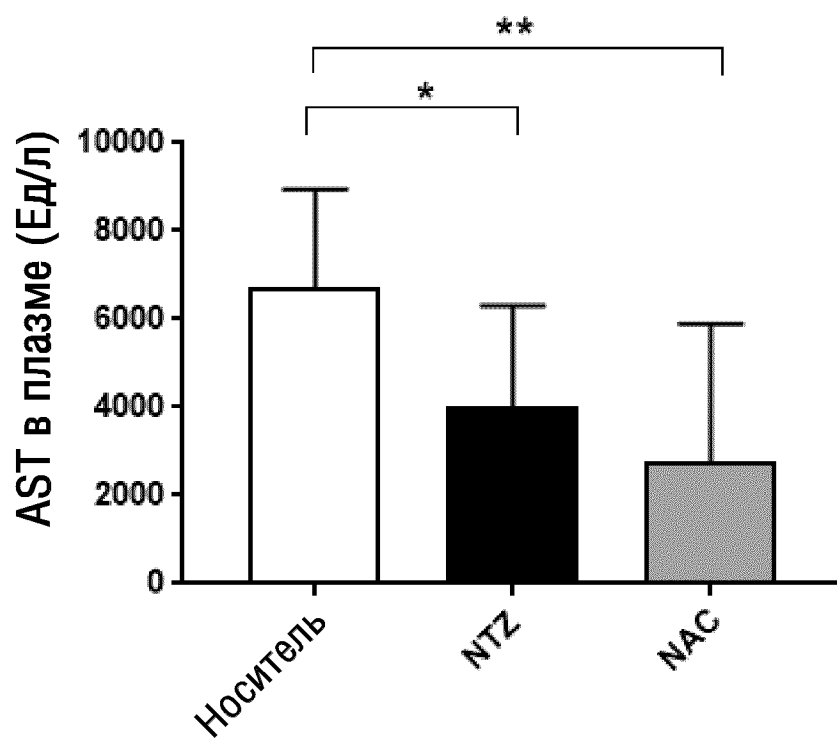
ФИГ.8



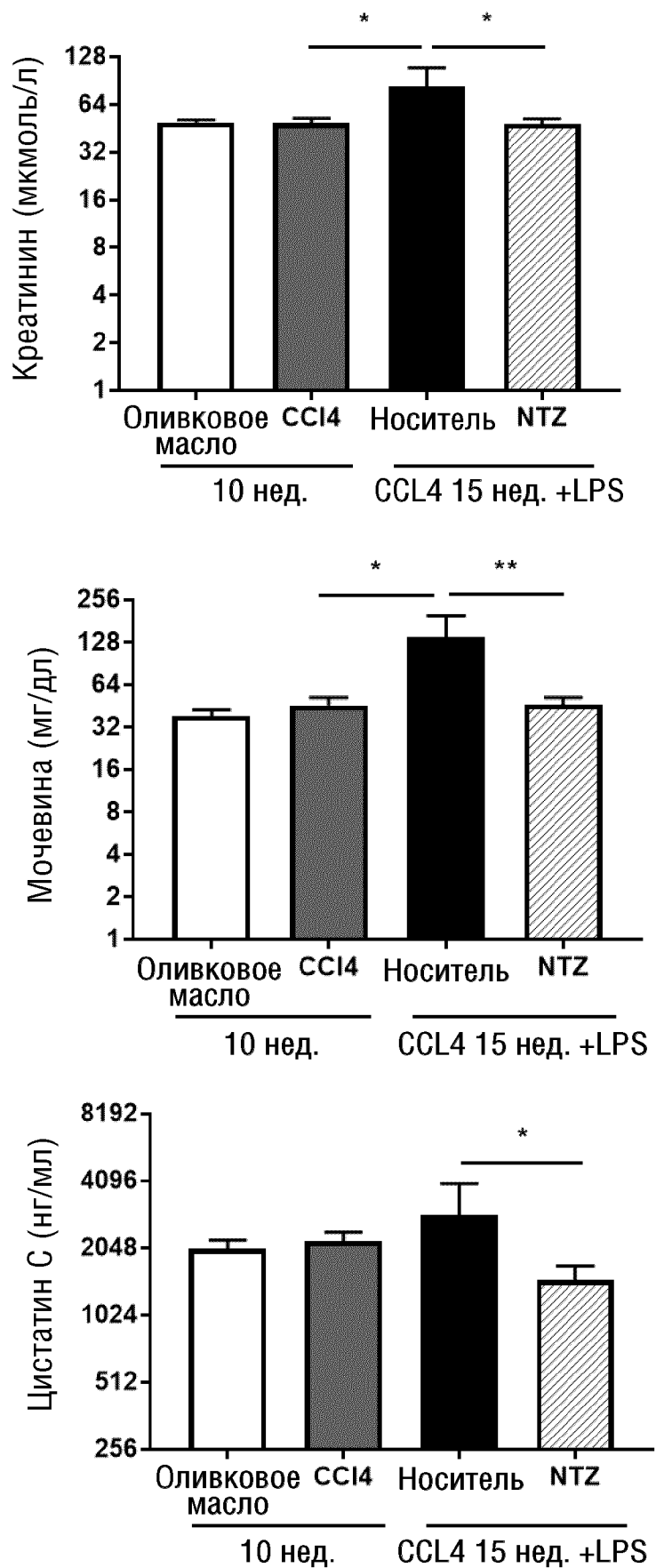
ФИГ.9



ФИГ.10

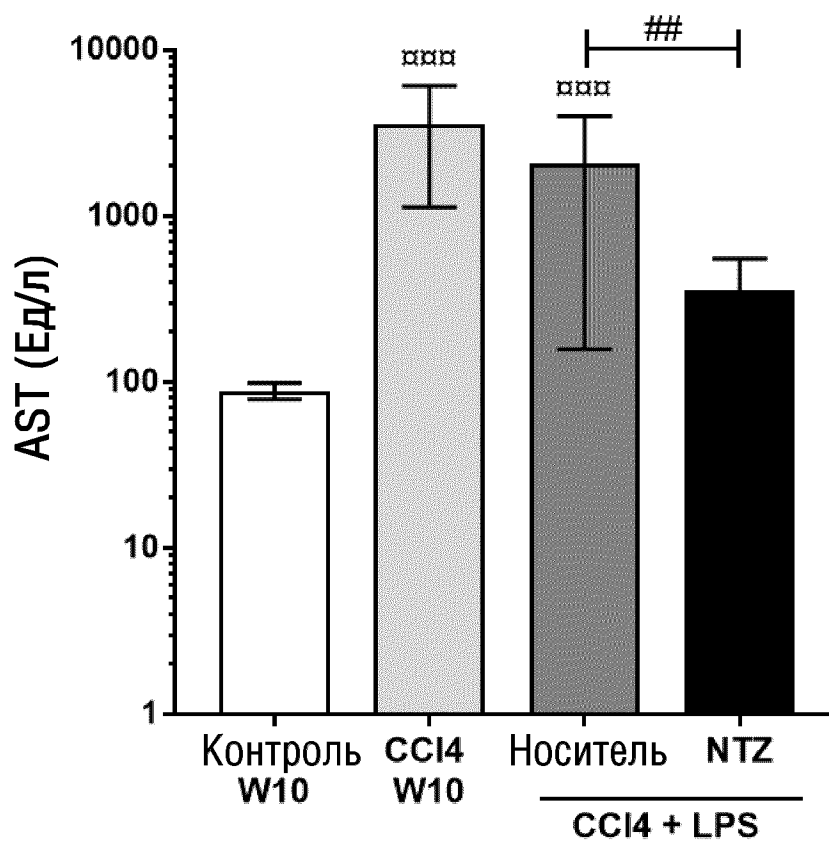
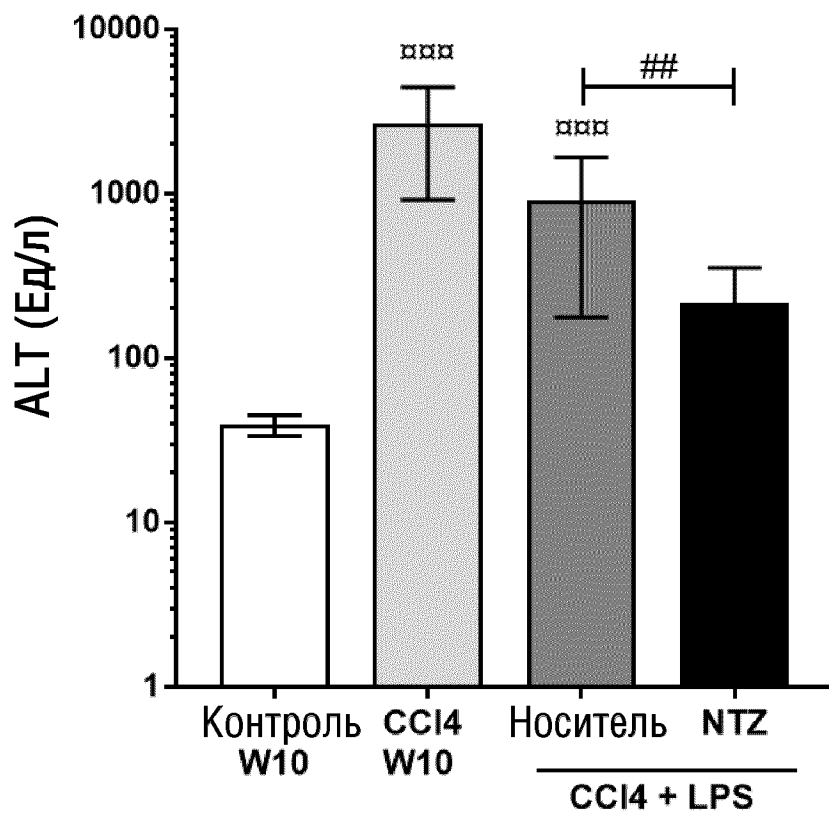


ФИГ.11

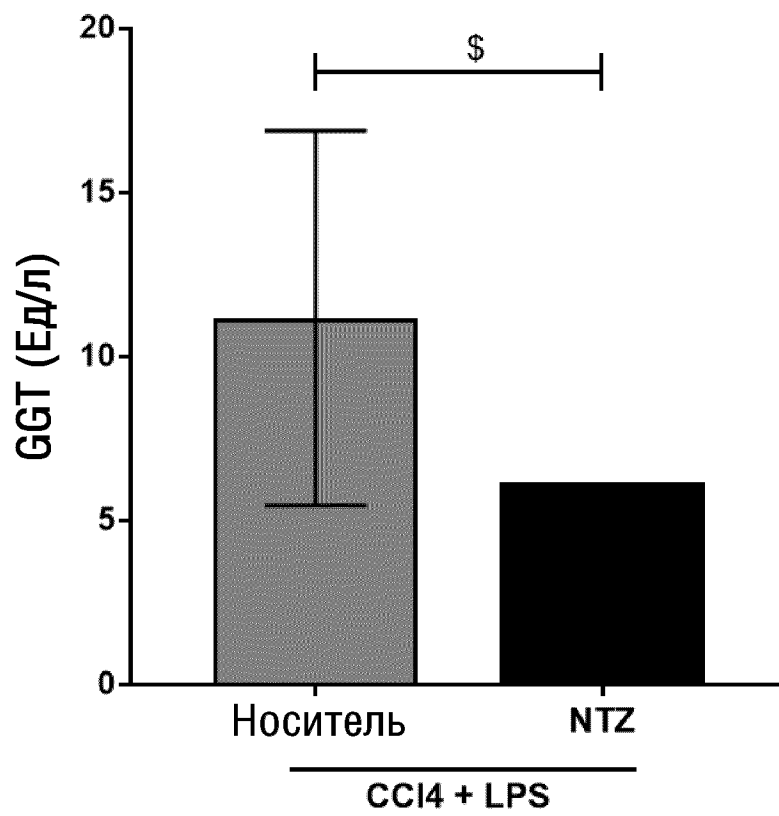




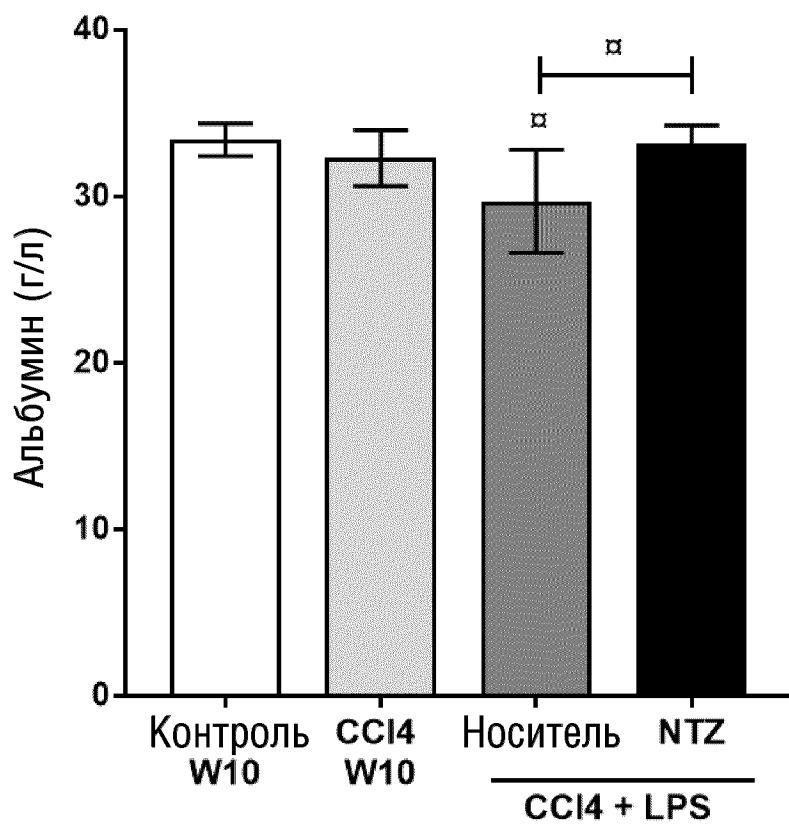
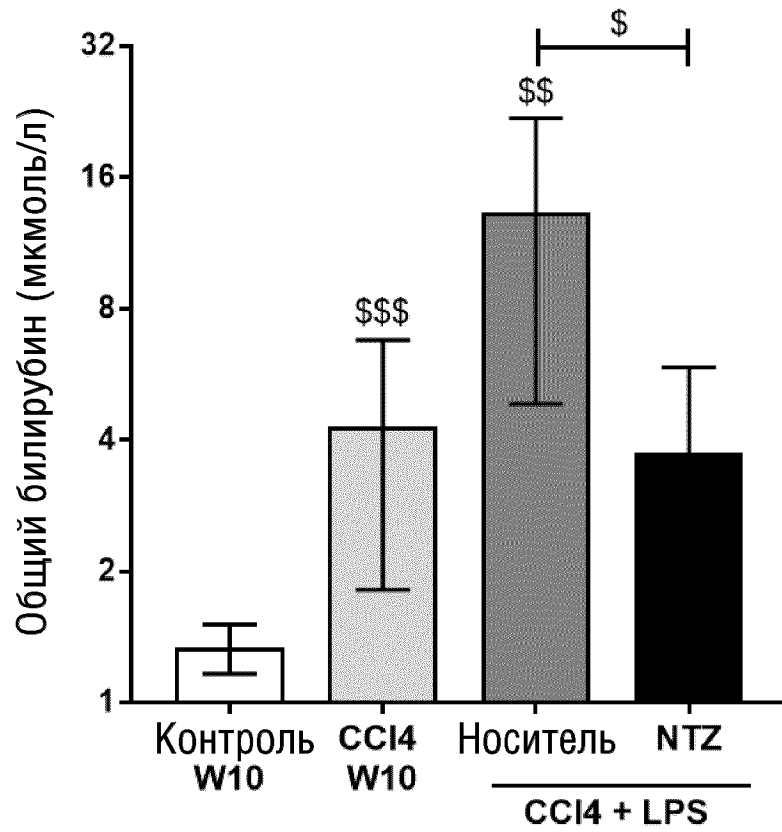
ФИГ.12



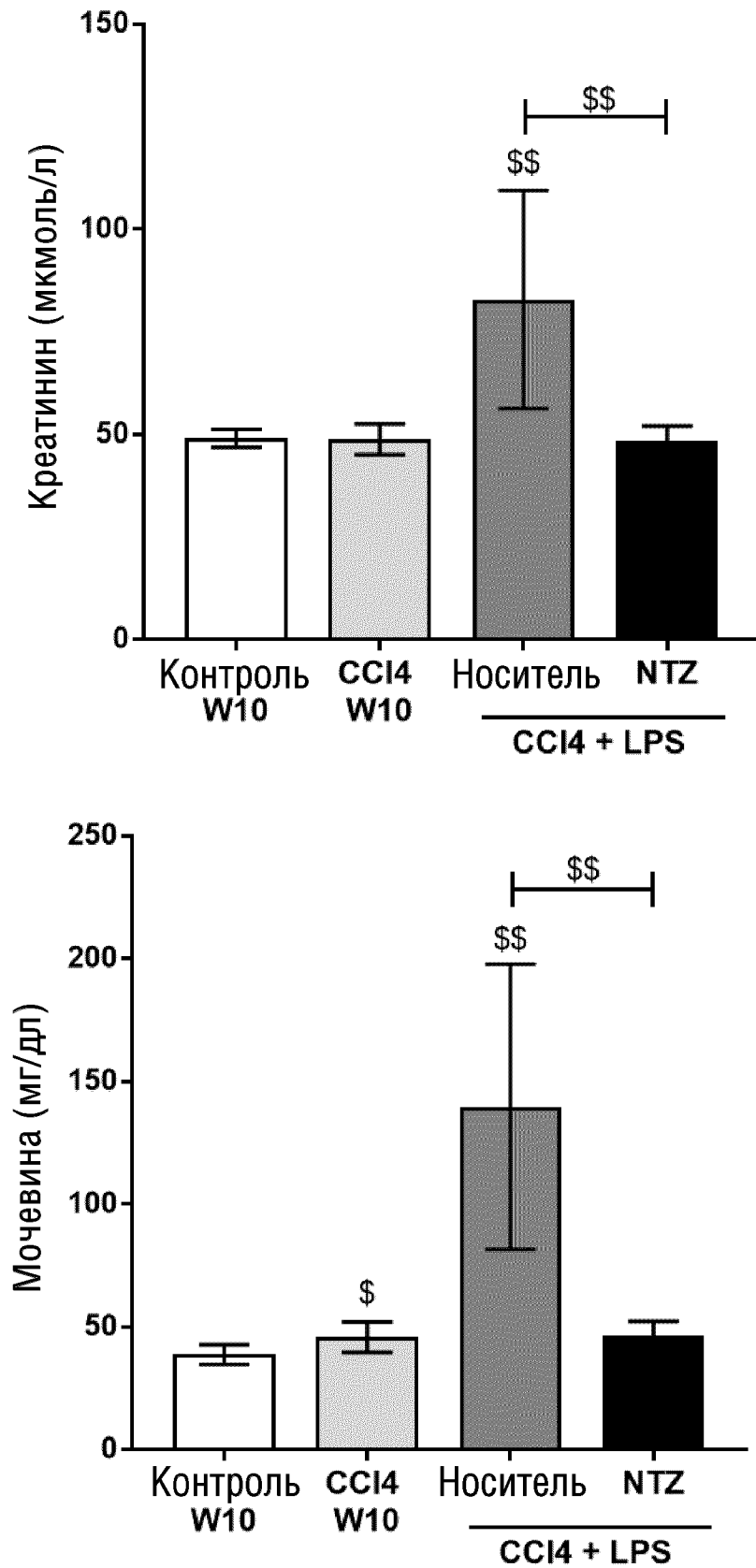
ФИГ.13



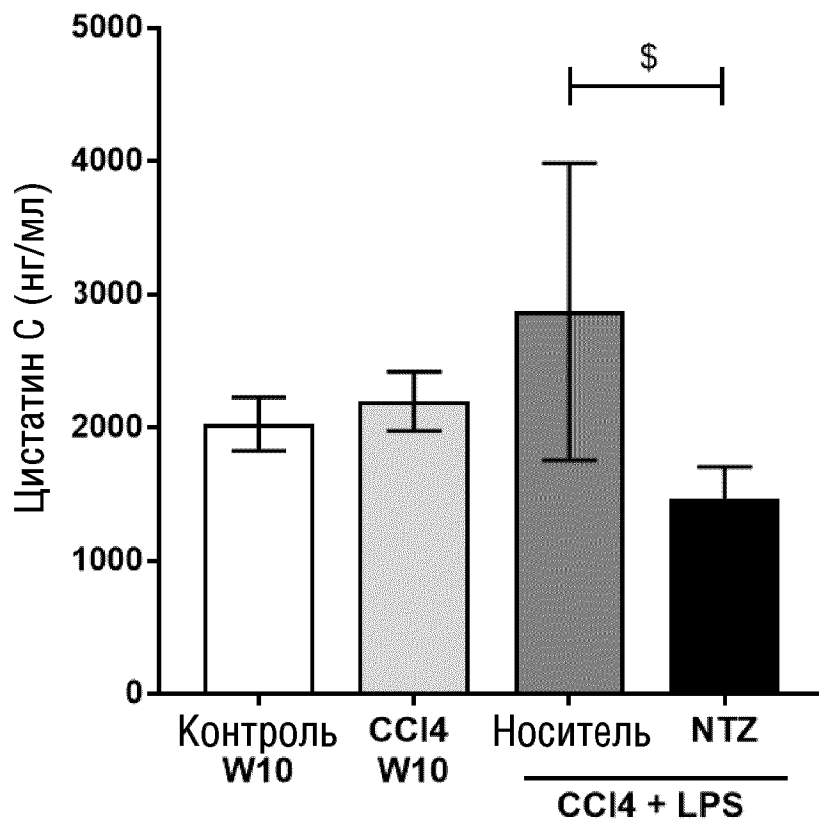
ФИГ.14



ФИГ.15



ФИГ.15 (приложение)



ФИГ.16

