



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94025 (13) C2

(51) МПК

A61K 31/454 (2011.01)

A61K 31/415 (2011.01)

A61P 1/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ЗАСТОСУВАННЯ АНТАГОНІСТІВ РЕЦЕПТОРА CB1 ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ЛІКУ-  
ВАННЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ

1

(21) a200610602  
(22) 08.03.2005  
(24) 11.04.2011  
(86) PCT/EP2005/003285, 08.03.2005  
(31) 04290633.9  
(32) 09.03.2004  
(33) EP  
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.  
(72) ЛОТЕРШТАЙН СОФІ, FR, МАЛЛА АРІАН, FR,  
ГРЕНАР ПАСКАЛЬ, FR, ЖЮЛЬЄН БОРИС, FR,  
ТРАН ВАН НХЬЄ ЖАННА, FR  
(73) ЕНСЕРМ, FR, САНОФІ-АВЕНТИС, FR  
(56) WO 2004/058744 A, 15.07.2004  
US 5 939 429 A, 17.08.1999  
WO 2004/007551 A, 22.01.2004  
WO 03/084930 A, 16.10.2003  
WO 03/084943 A, 16.10.2003  
WO 03/063781 A, 07.08.2003  
WO 03/087037 A, 23.10.2003  
EP 0 576 357 A, 29.12.1993  
WO 2004/008150 A, 22.01.2004  
GRECARD P ET AL: "REDUCED LIVER FIBROSIS  
IN CB1 RECEPTOR KNOCKOUT MICE" JOURNAL  
OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD  
INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN,  
DK, vol. 40, no. SUPPL 1, April 2004 (2004-04), page  
8  
BATKAI S ET AL: "ENDOCANNABINOID ACTING  
AT VASCULAR CB1 RECEPTORS MEDIATE THE  
VASODILATED STATE IN ADVANCED LIVER  
CIRRHOSIS" NATURE MEDICINE, NATURE  
PUBLISHING, CO, US, vol. 7, no. 7, July 2001 (2001-  
07), pages 827-832  
GABBAY EZRA ET AL: "Treatment with an  
endocannabinoid antagonist improves neurological  
function and survival in an animal model of fulminant  
hepatic failure." HEPATOLOGY, vol. 38, no. 4 Suppl.  
1, October 2003 (2003-10), page 541A  
JULIEN BORIS ET AL: "Activation of cannabinoid  
receptors leads to apoptosis of human hepatic  
myofibroblasts" HEPATOLOGY, vol. 36, no. 4 Part 2,  
October 2002 (2002-10), page 260A  
LOTTERSZTAJN SOPHIE ET AL: "CB2 receptors  
stimulate apoptosis of human hepatic myofibroblasts:

2

A novel antifibrogenic pathway in the liver?" FASEB  
JOURNAL, vol. 17, no. 4-5, March 2003 (2003-03)

(57) 1. Застосування антагоніста рецептора CB1 у  
виробництві композиції для лікування фіброзу пе-  
чінки.

2. Застосування за п.1, яке **відрізняється** тим, що  
антагоніст рецептора CB1 являє собою специфіч-  
ний антагоніст рецептора CB1.

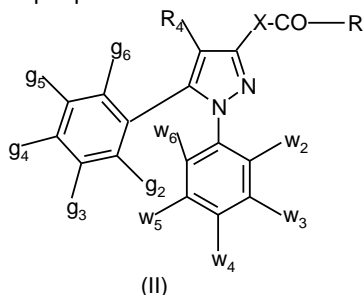
3. Застосування за п.1 або 2, яке **відрізняється**  
тим, що антагоніст являє собою сполуку формули  
II або одну з її фармацевтично прийнятних солей,  
де  $g_2, g_3, g_4, g_5$  і  $g_6$  та  $w_2, w_3, w_4, w_5$  і  $w_6$  є однако-  
вими або різними і незалежно являють собою во-  
день, атом хлору або бром,  $(C_1-C_3)$ алкіл,  $(C_1-$   
 $C_3)$ алкокси, трифторметил або нітрогрупу та  $g_4$   
необов'язково являє собою фенільну групу;  $R_4$   
являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $X$  являє со-  
бою прямий зв'язок або групу  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ , де  $R_5$   
являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл та  $x$  дорівнює  
0 або 1;  $R$  являє собою: групу  $-NR_1R_2$ , де  $R_1$  та  $R_2$   
незалежно являють собою  $(C_1-C_6)$ -алкіл; неарома-  
тичний  $(C_3-C_{15})$ карбоциклічний радикал, що необо-  
в'язково є заміщеним, вказані замісники не явля-  
ють собою заміщений карбоніл; групу аміно $(C_1-$   
 $C_4)$ алкіл, де аміно необов'язково дизаміщений  $(C_1-$   
 $C_3)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл  
являє собою  $C_3-C_{12}$ ; феніл, незаміщений або мо-  
нозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-$   
 $C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл;  
дифеніл $(C_1-C_3)$ алкіл; нафтил; антраценіл; насиче-  
ний 5-8-членний гетероциклічний радикал, неза-  
міщений або заміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом, гідрокси-  
лом або бензилом; 1-адамантилметил;  
ароматичний гетероцикл, незаміщений або моно-  
заміщений, або полізаміщений галогеном,  $(C_1-$   
 $C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси;  $(C_1-C_3)$ алкіл, замі-  
щений ароматичним гетероциклом, незаміщений  
або монозаміщений, або полізаміщений галоге-  
ном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; або ще  $R_1$   
являє собою водень та  $R_2$  є таким, як визначено  
вище; або ще  $R_1$  та  $R_2$  утворюють насичений 5-8-  
членний гетероциклічний радикал з атомом азоту,  
до якого вони приєднані, причому вказаний гете-  
роциклічний радикал не являє собою морфолін,  
якщо  $w_2, w_3, w_4, w_5, w_6, g_2, g_3, g_4, g_5$  і  $g_6$  всі являють

(13) C2

(11) 94025

(19) UA

собою водень; група  $R_2$  є такою, як визначено вище, якщо  $X$  являє собою  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ ; група  $R_5$ , якщо  $X$  являє собою прямий зв'язок,  $R_5$  являє собою  $(C_1-C_3)$ алкіл; а  $(C_3-C_{12})$ циклоалкіл, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_5)$ алкілом; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл, незаміщений або заміщений галогеном або  $(C_1-C_5)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$  і є незаміщеним або заміщеним  $(C_1-C_3)$ алкілом; або 2-норборнілметила



4. Застосування за будь-яким з пп.1-3, яке **відрізняється** тим, що антагоніст являє собою N-піперидин-3-піразолкарбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

5. Застосування за будь-яким з пп.1-3, яке **відрізняється** тим, що антагоніст являє собою N-піперидино-5-(4-бромфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-етилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

6. Застосування за будь-яким з пп.1-3, яке **відрізняється** тим, що антагоніст являє собою N-піперидино-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

7. Застосування за будь-яким з пп.1-6, яке **відрізняється** тим, що рецептор CB1 вибраний з групи, яка складається з:

а) білка, який має послідовність амінокислот, що включає SEQ ID NO:1 або частину SEQ ID NO:1, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

б) білка, який має послідовність амінокислот, що включає SEQ ID NO:2 або частину SEQ ID NO:2, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

с) алеля білка, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

д) білка, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO:1 із заміщенням фенілаланіну на лейцин в положенні 200; та/або заміщенням ізолейцину на валін в положенні 216; та/або заміщенням валіну на аланін в положенні 246;

е) білка, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO:2 із заміщенням фенілаланіну на лейцин в положенні 139; та/або заміщенням ізолейцину на валін в положенні 155; та/або заміщенням валіну на аланін в положенні 185; та

ф) білка, який включає послідовності амінокислот SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID

NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 та SEQ ID NO:9 або послідовності амінокислот, на 80% гомологічні вказаним, вказаний білок виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал.

8. Застосування за будь-яким з пп.1-7, яке **відрізняється** тим, що рецептор CB1 являє собою білок, який має гомологію на рівні амінокислот з SEQ ID NO:1 щонайменше 45%, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал.

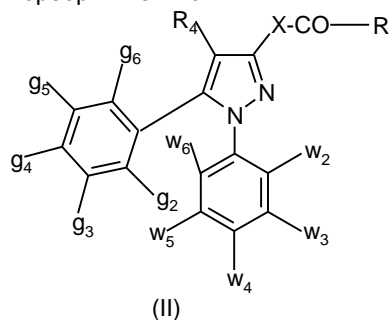
9. Застосування за п.8, яке **відрізняється** тим, що гомологія становить щонайменше 60%, переважно 70%, більш переважно 80%, навіть більш переважно 90% і більш переважно 95%.

10. Застосування за будь-яким з пп.1-9, яке **відрізняється** тим, що добова доза антагоніста рецептора CB1 становить від 0,01мг до 500мг, переважно від 1мг до 100мг.

11. Спосіб лікування фіброзу печінки у свавця, який **відрізняється** тим, що включає введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного антагоніста рецептора CB1 свавцеві, що потребує цього.

12. Спосіб за п.11, який **відрізняється** тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою сполуку формули II або одну з її фармацевтично прийнятних солей, де  $g_2$ ,  $g_3$ ,  $g_4$ ,  $g_5$  і  $g_6$  та  $w_2$ ,  $w_3$ ,  $w_4$ ,  $w_5$  і  $w_6$  є однаковими або різними і незалежно являють собою водень, атом хлору або бром,  $(C_1-C_3)$ алкіл,  $(C_1-C_3)$ алкокси, трифторметил або нітргрупу та  $g_4$  необов'язково являє собою фенільну групу;  $R_4$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $X$  являє собою прямий зв'язок або групу  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ , де  $R_5$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл та  $x$  дорівнює 0 або 1;  $R$  являє собою: групу  $-NR_1R_2$ , де  $R_1$  та  $R_2$  незалежно являють собою  $(C_1-C_6)$ -алкіл; неароматичний  $(C_3-C_{15})$ карбоциклічний радикал, необов'язково заміщений, причому вказані замісники не являють собою заміщений карбоніл; аміно $(C_1-C_4)$ алкільну групу, де аміно необов'язково дизаміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$ ; феніл, незаміщений або монозаміщений, або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл; дифеніл $(C_1-C_3)$ алкіл; нафтил; антраценіл; насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом, гідроксиллом або бензиллом; 1-адамантилметил; ароматичний гетероцикл, незаміщений або монозаміщений, або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси;  $(C_1-C_3)$ алкіл, заміщений ароматичним гетероциклом, незаміщений або монозаміщений, або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; або ще  $R_1$  являє собою водень та  $R_2$  є таким, як визначено вище; або ще  $R_1$  та  $R_2$  утворюють насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал з атомом азоту, до якого вони приєднані, вказаний гетероциклічний радикал не являє собою морфолін, якщо  $w_2$ ,  $w_3$ ,  $w_4$ ,  $w_5$ ,  $w_6$ ,  $g_2$ ,  $g_3$ ,  $g_4$ ,  $g_5$  і  $g_6$  всі являють собою водень; група  $R_2$  є такою, як визначено вище, якщо  $X$  являє собою  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ ;

групу  $R_5$ , якщо  $X$  являє собою прямий зв'язок,  $R_5$  являє собою  $(C_1-C_3)$ алкіл; а  $(C_3-C_{12})$ циклоалкіл, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_5)$ алкілом; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл, незаміщений або заміщений галогеном або  $(C_1-C_5)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$  і є незаміщеним або заміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом; або 2-норборнілметила



Винахід стосується нового застосування антагоністів рецептора CB1 для виробництва композиції, корисної в лікуванні захворювань печінки.

Фіброз печінки являє собою розповсюджену реакцію на хронічне ушкодження печінки, яке кінець кінцем призводить до цирозу та його ускладнень, портальної гіпертензії, печінкової недостатності і гепатоцелюлярної карциноми. Фіброгенний процес відбувається послідовно до інтенсивної проліферації та накопичення печінкових міофібробластів, які синтезують компоненти фіброзу та інгібітори деградації матриксу (Friedman, S.L., J. Biol. Chem. 275, 2247-50 (2000)).

*Cannabis sativa* (конопля посівна) містить понад шістьдесят сполук, найбільш активних з яких є  $(-)\Delta^9$ -тетрагідроканнабінол (ТГК). Також описані ендогенні природні канабіноїди, анандамід і 2-арахідонілгліцерин, що являють собою ліпідопохідні арахідонової кислоти (Piomelli, D et al., Trends Pharmacol. Sci. 21, 218-24 (2000)). Канабіноїди зв'язуються з двома рецепторами, сполученими з G білком, CB1 і CB2, які в рівній мірі зв'язуються з ТГК (Pertwee, R.G., Curr. Med. Chem. 6, 635-64 (1999)). Таким чином, CB1 являє собою один з двох клітинних рецепторів для канабіноїдів. Відомо, що вказаний рецептор являє собою сполучений з G білком трансмембранний рецептор, що експресується в мозку та кровоносних судинах (Pertwee, R.G., Curr. Med. Chem. 6, 635-64 (1999)), але не експресується в гепатоцитах (Guzman, M. & Sanchez, C, Life Sci. 65, 657-64 (1999)). CB1 опосередковує психотропну дію коноплі. Навпаки, рецептори CB2 експресуються головним чином в імунній системі і не пов'язані з психотропною дією (Friedman, S.L., J. Biol. Chem. 275, 2247-50 (2000)). На додаток до психотропних ефектів канабіноїди здійснюють центральну анальгетичну, протипухлинну та оксеригенну (oxerigenic) дію (Harrold, J. A. & Williams, G. Br. J. Nutr. 90, 729-34 (2003)). Більше того, канабіноїди також володіють протизапальними властивостями та здатністю розслаблювати судини (Kumar, R. N., Chambers, W. A. & Pertwee.,

13. Спосіб за п.11, який **відрізняється** тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидин-3-піразолкарбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

14. Спосіб лікування за п.11, який **відрізняється** тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидино-5-(4-бромфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-етилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

15. Спосіб за п.11, який **відрізняється** тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидино-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

16. Спосіб лікування за будь-яким з пп.11-15, який **відрізняється** тим, що добова доза антагоніста рецептора CB1 становить від 0,01мг до 500мг, переважно від 1мг до 100мг.

Anaesthesia 56, 1059-68 (2001)). Декілька досліджень також вказують на те, що канабіноїди потенційно можуть здійснювати протипухлинну дію завдяки їхній здатності спричиняти регресію різних типів експериментальних пухлин, в тому числі гліоми або пухлин шкіри. Вказані протипухлинні ефекти головним чином пов'язані з їхніми антипроліферативними та апоптотичними властивостями (Birulco, M. et al., Faseb J. 29, 29 (2001); Casanova, M. L. et al., J. Clin. Invest. 113, 43-50. (2003); Sanchez, C et al., Cancer Res. 61, 5784-9 (2001)).

Існують тільки обмежені дані стосовно дії канабіноїдів на печінку. Рецептори CB1 і CB2 не експресуються в гепатоцитах (Guzman, M. & Sanchez, C. Life Sci. 65, 657-64 (1999)). Однак, рецептори CB1 присутні в ендотеліальних клітинах, виділених з печінкових артерій, та їхня експресія збільшується при цирозі (Batkai, S. et al., Nat. Med. 7, 827-32. (2001)).

Виділені дві ізоформи рецептора CB1: довга ізоформа (відповідає SEQ ID NO:1) і більш коротка ізоформа, обрізана на ділянці МНГ-кінця, яка відповідає варіанту домішки (відповідно до SEQ ID NO: 2), що відрізняються за своєю спорідненістю до своїх лігандів (Shire. et al., J. Biol. Chem. (1995); Rinaldi-Carmona et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. (1996)). Також існує 5 одинарний поліморфізм нуклеотиду в кодуючій ділянці гена рецептора CB1. Тільки 3 з них приводять до зміни однієї амінокислоти в рецепторі CB1 (вони наведені в SEQ ID NO: 1, заміщення фенілаланіну на лейцин в положенні 200, заміщення ізолейцину на валін в положенні 216 і заміщення валіну на аланін в положенні 246 і відповідні положення в SEQ ID NO: 2). Існує консенсус послідовності 7-доменів для рецептора CB1, який є високою мірою консервативним у хребцевих, але не з'являється в інших рецепторах канабіноїдів (Atwood, T.K. and Findlay, J.B.C., Protein. Eng. 7(2) 195-203 (1994), Atwood, T. K. and Findlay, J. B. C, 7TM, Volume 2 Eds G Vriend and B. Bywater, (1993), Birnbaumer, L., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30, 675-705 (1990), Casey, P. J.

and Gilman, A. G., J. Biol. Chem. 263(6) 2577-2580 (1988), 5. Atrwood, T.K. and Findlay, J. B.C, Protein. Eng. 6 (2) 167-176 (1993), Watson, S. and Arkinsall, S, In The G Protein-Linked Receptor Factsbook, Academic press, 1994, PP 80-83). Вказана консенсусна послідовність амінокислот включає 7 білкових доменів від SEQ ID NO: 3 до SEQ ID NO: 9.

Раніше були описані антагоністи рецептора CB1, які включають перевернуті або зворотні агоністи. Вони включають заміщені аміді, описані в WO 03/077847, заміщені ариламіді, описані в WO 03/087037, заміщені імідазоли, описані в WO 03/063781, біциклічні аміді, описані в WO 03/086288, терпенові похідні, описані в WO 03/084943, N-піперидон-3-піразолкарбоксамід і N-піперидин-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід, описаний в EP-B656354, сполуки арил-бензо[b]тіофену і бензо[b]фурану, описані в US 5596106 та US 5747524, відповідно, похідні азетидину, описані у FR 2805817, 3-аміноазетидин, описаний у FR 2805810, або 3-заміщені або 3,3-дизаміщені похідні 1-(ди-((гетеро)арил)-метил)азетидину, описані у FR 2805818. Вказані документи включені до даного опису шляхом посилання. Комерційно доступні інші антагоністи, такі як N-(піперидин-1-іл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-5-(4-йодфеніл)-4-метил-1H-піразол-3-карбоксамід, комерційно відомий як AM251, і сполука, відома як LY-320135.

Відоме застосування вказаних антагоністів рецептора CB1 для лікування сексуальної дисфункції (патентна заявка WO 03/082256) або діареї (патентна заявка WO 01/85092) або нейро-запальних захворювань або розладів, пов'язаних із зловживанням речовинами, що спричиняють звикання та пристрасть, ожиріння, астми, закрепів (патентна заявка WO 03/077847).

Документи US 5939429, WO 03/077847, WO 03/084930, WO 03/084943, WO 03/063781 та WO 03/087037 розкривають, що антагоністи CB1 можуть обертати системні зміни гемодинаміки у щурів з циротичною портальною гіпертензією.

Однак, згадані вище документи не розкривають, що антагоністи CB1 можуть зменшувати фіброгенез при печінкових захворюваннях будь-якої етіології (алкогольної, вірусної, токсичної). Більше того, не існує відомого залучення рецепторів CB1 або дії антагоністів CB1 при неалкогольному стеатогепатиті (steatohepatitis) і канцерогенезі печінки.

Винахідники несподівано продемонстрували, що антагоністи CB1 володіють потужними проти-фіброзними властивостями в печінці, які можуть бути використані для лікування захворювань печінки і переважно захворювань печінки, які ведуть до фіброзу печінки.

Відповідно, у винаході, на базі знахідок того, що інактивація рецепторів CB1 може зменшувати фіброгенез печінки, пов'язаний з пошкодженням або захворюванням печінки, забезпечує численні способи і композиції для лікування захворювань печінки і, переважно, захворювань печінки, які ведуть до фіброзу печінки. Таким чином, винахід стосується:

1. Застосування антагоніста рецептора CB1 у виробництві композиції для лікування захворювань печінки.

2. Застосування за п.1, яке відрізняється тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою специфічний антагоніст рецептора CB1.

3. Застосування за пп.1 або 2, яке відрізняється тим, що захворювання печінки призводить до фіброзу печінки.

4. Застосування за пп.1-3, яке відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою алкогольний цироз печінки.

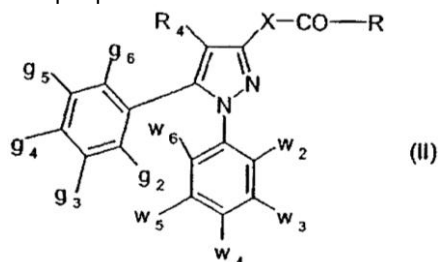
5. Застосування за пп.1-3, яке відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою хронічний вірусний гепатит.

6. Застосування за пп.1-3, яке відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою неалкогольний стеатогепатит.

7. Застосування за пп.1-3, яке відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою первинний рак печінки.

8. Застосування за пп.1-7, яке відрізняється тим, що антагоніст являє собою сполуку формули II або одну з її фармацевтично прийнятних солей, де  $g_2$ ,  $g_3$ ,  $g_4$ ,  $g_5$  і  $g_6$  та  $w_2$ ,  $w_3$ ,  $w_4$ ,  $w_5$  і  $w_6$  є однакови або різними і незалежно являють собою водень, атом хлору або бром,  $(C_1-C_3)$ алкіл,  $(C_1-C_3)$ алкокси, трифторметил або нітрогрупу та  $g_4$  необов'язково являє собою фенільну групу;  $R_4$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $X$  являє собою прямий зв'язок або групу  $-(CH_2)_x-M(R_3)-$ , де  $R_3$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл та  $x$  дорівнює 0 або 1;  $R$  являє собою: групу  $-NR_1R_2$  де  $R_1$  і  $R_2$  незалежно являють собою  $(C_1-C_6)$ -алкіл; неароматичний  $(C_3-C_{15})$  карбоциклічний радикал, що являє собою необов'язково заміщений, вказані замісники не являють собою заміщений карбоніл; групу амін  $(C_1-C_4)$ алкіл, де аміно необов'язково дизаміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом; циклоалкіл  $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$ ; феніл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; фетл  $(C_1-C_3)$ алкіл; дифеніл  $(C_1-C_3)$ алкіл; нафтил; антраценіл; насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом, гідроксиллом або бензиллом; 1-адамантилметил; ароматичний гетероцикл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси;  $(C_1-C_3)$ алкіл, заміщений ароматичним гетероциклом, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; або ще  $R_1$  являє собою водень та  $R_2$  є таким, як визначено вище; або ще  $R_1$  і  $R_2$  утворюють насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал з атомом азоту до якого вони приєднані, вказаний гетероциклічний радикал не являє собою морфолін, якщо  $w_2$ ,  $w_3$ ,  $w_4$ ,  $w_5$ ,  $w_6$ ,  $g_2$ ,  $g_3$ ,  $g_4$ ,  $g_5$  і  $g_6$  всі являють собою водень; група  $R_2$  є такою, як визначено вище, якщо  $X_1$  являє собою  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ ; група  $R_5$  якщо  $X$  являє собою прямий зв'язок,  $R_5$  являє собою  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $(C_3-C_{12})$ циклоалкіл, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_5)$ алкілом; феніл  $(C_1-C_3)$ алкіл, незаміщений або заміщений галогеном або  $(C_1-C_5)$ алкілом; циклоалкіл  $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$  і

є незаміщеним або заміщений (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкілом; або 2-норборнілметил.



9. Застосування за пп.1-7, яке відрізняється тим, що антагоніст являє собою N-піперидон-3-піразолкарбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

10. Застосування за пп.1-7, яке відрізняється тим, що антагоніст являє собою N-піперидин-5-(4-бромфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-етилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

11. Застосування за пп.1-7, яке відрізняється тим, що антагоніст являє собою N-піперидин-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

12. Застосування у відповідності до будь-якого з попередніх пунктів, яке відрізняється тим, що рецептор CB1 вибраний з групи, що складається з:

а) білка, який має послідовність амінокислот, що включає SEQ ID NO: 1 або частину SEQ IDNO: 1, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

б) білка, який має послідовність амінокислот, що включає SEQ ID NO:2 або частину SEQ ID NO:2, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

с) алель білка, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO:2, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал;

д) білок, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO:1 із заміщенням фенілаланіну на лейцин в положенні 200; та/або заміщенням ізолейцину на валін в положенні 216; та/або заміщенням валіну на аланін в положенні 246;

е) білок, який має послідовність амінокислот SEQ ID NO:2 із заміщенням фенілаланіну на лейцин в положенні 139; та/або заміщенням ізолейцину на валін в положенні 155; та/або заміщенням валіну на аланін в положенні 185; та

ф) білок, який включає послідовності амінокислот SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 та SEQ ID NO:9 або послідовності амінокислот, на 80% гомологічні вказаним, причому вказаний білок виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал.

13. Застосування за пп.1-11, яке відрізняється тим, що рецептор CB1 являє собою білок, який на рівні амінокислот має гомологію з SEQ ID NO:1

щонайменше 45%, який виконує біологічну функцію сполученого з G білком клітинного рецептора, здатний зв'язуватися з THC і перетворювати клітинний сигнал.

14. Застосування у відповідності до попереднього пункту, яке відрізняється тим, що гомологія становить щонайменше 60%, переважно 70%, більш переважно 80%, навіть більш переважно 90% і більш переважно 95%.

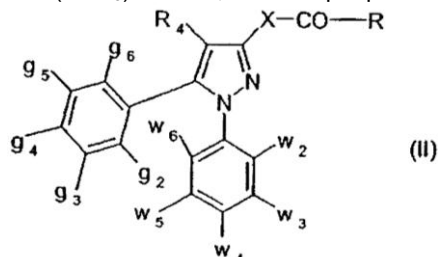
15. Застосування у відповідності до будь-якого з попередніх пунктів, яке відрізняється тим, що добова доза антагоніста рецептора CB1 становить від 0,01мг до 500мг, переважно від 1мг до 100мг.

16. Застосування послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує білок, що включає SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2 або частину SEQ ID NO:1 або частину SEQ ID NO:2 для одержання композиції для лікування захворювань печінки шляхом регуляції вниз або пригнічення рецептора CB 1.

17. Спосіб лікування захворювань печінки у ссавця, який відрізняється тим, що включає введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного антагоніста рецептора CB 1 ссавцеві, що потребує цього.

18. Спосіб лікування захворювань печінки за п.17, який відрізняється тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою сполуку формули II або одну з її фармацевтично прийнятних солей, де g<sub>2</sub>, g<sub>3</sub>, g<sub>4</sub>, g<sub>5</sub> і g<sub>6</sub> та w<sub>2</sub>, w<sub>3</sub>, w<sub>4</sub>, w<sub>5</sub> і w<sub>6</sub> є однаковими або різними і незалежно являють собою водень, атом хлору або бром, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкокси, трифторметил або нітрогрупу та g<sub>4</sub> необов'язково являє собою фенільну групу; R<sub>4</sub> являє собою водень або а (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл; X являє собою прямий зв'язок або групу -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-N(R<sub>3</sub>)-, де R<sub>3</sub> являє собою водень або (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл та x дорівнює 0 або 1; R являє собою: групу -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> де R<sub>1</sub> та R<sub>2</sub> незалежно являють собою (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкіл; неароматичний (C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub>) карбоциклічний радикал, що являє собою необов'язково заміщений, вказані замісники не являють собою заміщений карбоніл; аміно(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкільну групу, де аміно необов'язково дизаміщений (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкілом; циклоалкіл(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкілом, де циклоалкіл являє собою C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>; феніл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкілом або (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкокси; феніл(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл; дифеніл(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл; нафтил; антраценіл; насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал, незаміщений або заміщений (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкілом, гідроксилем або бензилем; 1-адамантилметил; ароматичний гетероцикл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкілом або (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкокси; (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкіл, заміщений ароматичним гетероциклом, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкілом або (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)алкокси; або ще R<sub>i</sub> являє собою водень та R<sub>2</sub> являє собою як визначено вище; або ще R<sub>1</sub> та R<sub>2</sub> утворюють насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал з атомом азоту до якого вони приєднані, вказаний гетероциклічний радикал не являє собою морфолін, де w<sub>2</sub>, w<sub>3</sub>, w<sub>4</sub>, w<sub>5</sub>, w<sub>6</sub>, g<sub>2</sub>, g<sub>3</sub>, g<sub>4</sub>, g<sub>5</sub> і g<sub>6</sub> всі являють собою водень; група R<sub>2</sub> є такою, як визначено вище, якщо X являє собою -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-N(R<sub>3</sub>)-; групу R<sub>5</sub> якщо X являє собою прямий зв'язок, R<sub>5</sub> являє со-

бою ( $C_1$ - $C_3$ )алкіл; ( $C_3$ - $C_{12}$ )циклоалкіл, незаміщений або заміщений ( $C_1$ - $C_5$ )алкілом; феніл( $C_1$ - $C_3$ )алкіл, незаміщений або заміщений галогеном або ( $C_1$ - $C_5$ )алкілом; циклоалкіл( $C_1$ - $C_3$ )алкіл де циклоалкіл являє собою  $C_3$ - $C_{12}$  і є незаміщеним або заміщеним ( $C_1$ - $C_5$ )алкілом; або 2-норборнілметил.



19. Спосіб лікування захворювань печінки за п.17, який відрізняється тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидон-3-піразолкарбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

20. Спосіб лікування захворювань печінки за п.17, який відрізняється тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидино-5-(4-бромфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-етилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

21. Спосіб лікування захворювань печінки за п.17, який відрізняється тим, що антагоніст рецептора CB1 являє собою N-піперидино-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід або одну з його фармацевтично прийнятних солей.

22. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-21, який відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою фіброз печінки.

23. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-21, який відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою алкогольний цироз печінки.

24. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-21, який відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою хронічний вірусний гепатит.

25. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-21, який відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою неалкогольний стеатогепатит.

26. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-21, який відрізняється тим, що захворювання печінки являє собою первинний рак печінки.

27. Спосіб лікування захворювань печінки за пп.17-26, який відрізняється тим, що добова доза антагоніста рецептора CB1 становить від 0,01мг до 500мг, переважно від 1мг до 100мг.

Фіг.1: Гістограма, яка демонструє вміст в печінці TGFP-1 в пг на мг розчинного білка (панель А) і демонструє експресію  $\alpha$ -актину в гладких м'язах печінки як відсоток забарвлення загальної секції площі поверхні (панель В), як у мишей дикого типу (показані як WT) і CB1-дефіцитних мишей (показані як CB1-/-). Позначення "ОО" стосується групи мишей, які одержували тільки оливкову олію, тоді як позначення "CCl<sub>4</sub>" стосується результатів для мишей з інтоксикацією CCl<sub>4</sub>.

Вимірювали продукування TGF $\beta$ -1 в печінці (статистична значущість відповідає  $p < 0,05$ ). Для

оцінки  $\alpha$ -актину гладких м'язів забарвлення кількісно оцінювали на 4-5 зрізах тканини печінки для кожної тварини (статистична значущість відповідає  $p < 0,05$ ).

Фіг.2: Гістограми, які показують життєздатність печінкового міофібробласта (панель А) і каспаза-3-подібну активність (панель В) на початку і через 48год. після виснаження сироватки, відповідно, у мишей дикого типу (WT) і CB1-дефіцитних мишей (CB1KO). Апоптоз індукували шляхом позбавлення сироватки на 48год. Результати життєздатності печінкового міофібробласта виражені як середній відсоток клітин, що вижили,  $\pm$  стандартна помилка середнього з 6-9 експериментів, проведених на клітинах, виділених з печінки 3 WT та 2 CB1-/- мишей (статистична значущість  $p$  є нижчою за 0,05 для CB1-/-). Результати для каспаза-3-подібної активності накладені на активність, виміряну в день 0 (середнє значення  $\pm$  стандартна помилка середнього, одержані з 6-9 експериментів, проведених на клітинах, виділених з печінки 3 WT і 3 CB1-/-мишей). Статистично  $p$  є нижчим за 0,05.

Фіг.3: Графіки показують вплив підвищених кількостей антагоніста CB1 SR141716 на синтез ДНК в печінкових міофібробластах людини (панель А), а також мишей дикого типу (показано як WT) і CB1-дефіцитних мишей (показано як CB1KO) (панель В). Синтез ДНК виражали як відсоток синтезу ДНК у клітинах, оброблених розчинником SR141716, в залежності від збільшення концентрації SR141716 в нМ. Клітини печінкових фібробластів людини стимулювали протягом 30год. різними концентраціями антагоніста рецептора CB1 SR141716 в присутності 20нг/мл PDGF-BB. Інкорпорацію [<sup>3</sup>H]-тимідину в ДНК вимірювали як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка середнього для 3-6 експериментів і виражали як відсоток контрольних значень ( $p$  менше 0,05). Прямокутники помилки показані на графіку. Печінкові міофібробласти мишей (для мишей дикого типу показані на графіку колами, для CB1-дефіцитних мишей показані діамантами) стимулювали протягом 30год. різними концентраціями антагоніста CB1-рецептора SR141716 в присутності 20нг/мл PDGF-BB. Інкорпорацію [<sup>3</sup>H]-тимідину в ДНК вимірювали як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка середнього для 3-6 експериментів, одержані з клітин, виділених з печінки 3 WT мишей і 3 CB1-/- мишей і виражали як відсоток контрольних значень ( $p$  менше 0,05). Прямокутники помилки показані на графіку.

Фіг.4: Графік показує вплив SR141716 або розчинника на смертність, спричинену тетрахлоридом вуглецю у мишей. Показано виживаність оброблених CCl<sub>4</sub> мишей, лікованих SR141716 (пунктирні лінії) або за відсутності лікування (суцільні лінії, які показують введення тільки розчинника без антагоніста CB1) в часі (дні). Час введення CCl<sub>4</sub> показано стрілкою.

Винахід забезпечує способи і композиції (такі як фармацевтичні композиції) для лікування захворювань печінки, в тому числі фіброзу печінки. Захворювання печінки також включають, не обмежуючись ними, алкогольний цироз печінки, хронічний вірусний гепатит, неалкогольний стеатогепатит і первинний рак печінки.

Заявником продемонстровано, що регуляція вниз рецепторів CB1 і застосування антагоніста або зворотного агоніста рецептора CB1 забезпечує лікування різних типів фіброзу печінки. Це продемонстровано в кількох експериментах.

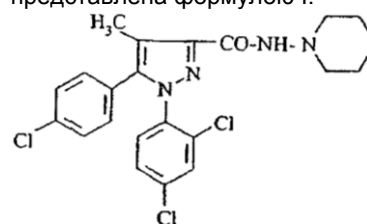
По-перше, роль рецепторів CB1 в прогресуванні фіброзу печінки досліджували на позбавлених CB1 рецептора мишах, створених таким чином, щоб експресія рецепторів CB1 була відсутня (CB1KO,  $n=15$ ) та їх двійниках дикого типу (WT,  $n=12$ ) на моделі хронічної інтоксикації тетрахлоридом вуглецю, яка спричиняє фіброз. Фіброз і нейро-запалення оцінювали за шкалою на базі METAVIR. Миші CB1KO демонстрували зменшення фіброзу в порівнянні з тваринами WT (шкала фіброзу:  $2,59 \pm 0,13$  проти  $3,33 \pm 0,13$ ,  $p < 0,05$ ). Відповідно, печінковий колаген, який оцінювали шляхом визначення гідроксипроліну, був знижений на 40% у мишей CB1KO в порівнянні з тваринами WT ( $0,46 \pm 0,06$  проти  $0,73 \pm 0,11$  мг/мг тканини,  $p < 0,05$ ). Бали нейро-запалення були подібними в обох групах. Така інактивація рецептора CB1 є фенотипічно еквівалентною досконалому антагоністичному блоку рецептора CB1 фармацевтичними засобами. Фіброз печінки був істотною мірою знижений у мишей з відсутнім CB1 в порівнянні з контрольними мишами, за даними гістологічного аналізу печінки та вимірювання вмісту гідроксипроліну, специфічного біохімічного маркера відкладення колагену. Крім того, було показано, що експресія TGF $\beta$ -1 та  $\alpha$ -актину гладких м'язів після обробки CCl $_4$  були знижені у CB1-дефіцитних мишей в порівнянні з мишами дикого типу. Кінець кінцем, було показано, що інактивація CB1 збільшує апоптоз в печінкових міофібробластах миші. Таким чином, інактивація рецептора CB1 зменшує фіброз печінки.

По-друге, здійснювали імуногістохімічне мічення нормальних печінкових фібробластів людини, а також одержаних з циротичної печінки та культивованих. Імунохімія продемонстрували слабку експресію рецепторів CB1 в нормальній печінці ( $n=3$ ), на протилежність помітній регуляції вгору в циротичних зразках різноманітної етіології ( $n=13$ ), домінуючи в непаренхимних клітинах всередині і на кінцях фіброзних перетинок. Подвійний імуногістохімічний аналіз ідентифікував міофібробласти як основне джерело рецепторів CB1 і, відповідно, рецептори CB1 також експресувалися в культивованих печінкових міофібробластах людини. Рецептори CB1 слабо експресувалися внутрішньосинусоїдальними клітинами в нормальній печінці і помітно регулювалися вгору під час хронічних захворювань печінки. Подвійний імуногістохімічний аналіз виявив печінкові міофібробласти як очевидний тип клітин, що експресує рецептори CB1 в циротичній печінці. Таким чином, експресія та активність рецептора CB1 корелює з фіброзом печінки.

По-третє, були проведені епідеміологічні дослідження когорти пацієнтів з хронічним гепатитом C і було продемонстровано, що щоденне куріння конопль є фактором ризику прогресування фіброзу при хронічному гепатиті C і швидкість (частота) фіброзу є вищою у таких пацієнтів в порівнянні з

тими, хто не курить коноплю. Одержані дані демонструють участь канабіноїдного перетворення сигналу у фіброзі печінки. Таким чином, до фіброзу печінки залучено канабіноїдний сигнальний шлях.

По-четверте, дослідження впливу антагоніста рецептора CB1 N-піперидин-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксаміду, відомого на ринку як SR141716 (або SR141716A) на римонабант (rimonabant) *in vitro* були здійснені на культурах печінкових міофібробластів людини і мишей і продемонстрували, що антагоніст CB1 може інгібувати ріст печінкових міофібробластів. Вказана сполука та її виготовлення описані в Європейській патентній заявці EP656354-A1 і сполука представлена формулою I:



(I)

Такий антагоніст CB1 і його фармацевтично прийнятні солі можуть бути виготовлені у відповідності до Європейської патентної заявки EP 656354 і подібним чином фармацевтичні композиції можуть бути виготовлені у відповідності до опису того ж патенту.

По-п'яте, дослідження *in vivo* на мишах продемонстрували, що антагоніст CB1 SR141716 може зменшувати смертність, спричинену тетрахлоридом вуглецю, обробка яким є моделлю спричиненого фіброзу печінки.

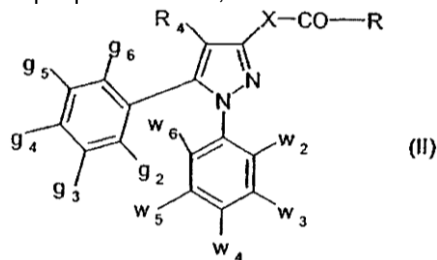
Антагоністи рецептора CB1 в даному описі визначаються як сполуки, здатні інгібувати активацію або експресію рецептора CB1.

Сполуки, здатні інгібувати активацію рецептора CB1, конкретно включають ті сполуки, які здатні взаємодіяти з агоністами рецепторів CB1, інгібувати зв'язування вказаних агоністів або інгібувати активацію рецептора CB1 в результаті вказаного зв'язування.

Конкретно, придатні антагоністи рецептора CB1 можуть бути або не бути специфічними відносно CB1 та включають зворотні агоністи. Вказані антагоністи також включають заміщені аміді, описані WO 03/077847, заміщені арилами, описані в WO 03/087037, заміщені імідазоли, описані в WO 03/063781, біциклічні аміді, описані в WO 03/086288, терпентильні похідні, описані в WO 03/084943, N-піперидон-3-піразолкарбоксамід і N-піперидин-5-(4-хлорфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-метилпіразол-3-карбоксамід, описаний в EP-B656354, сполуки арил-бензо[b]тіофену і бензо[b]фурану, описані в US5596106 та US5747524, відповідно, похідні азетидину, описані у FR2805817, 3-аміноазетидин, описаний у FR2805810, або 3-заміщені або 3,3-дизаміщені похідні 1-(ди-((гетеро)арил)-метил)азетидину, описані у FR2805818, N-(піперидин-1-іл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-5-(4-йодфеніл)-4-метил-1H-піразол-3-карбоксамід (відомий як AM251) і сполуку, відому

як LY-320135. Придатні антагоністи CB1 також включають N-піперидин-5-(4-бромфеніл)-1-(2,4-дихлорфеніл)-4-етилпіразол-3-карбоксамід, описаний в патенті EP1150961.

Інші придатні антагоністи CB1 описані в патенті EP576357 і включають сполуку формули II, де  $g_2, g_3, g_4, g_5$  і  $g_6$  та  $w_2, w_3, w_4, w_5$  і  $w_6$  є однаковими або різними і незалежно являють собою водень, атом хлору або бром,  $(C_1-C_3)$ алкіл,  $(C_1-C_3)$ алкокси, трифторметил або нітрогрупу та  $g_4$  необов'язково являє собою фенільну групу;  $R_4$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $X$  являє собою прямий зв'язок або групу  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ , де  $R_3$  являє собою водень або  $(C_1-C_3)$ алкіл та  $x$  дорівнює 0 або 1;  $R$  являє собою: групу  $-NR_1R_2$  де  $R_1$  і  $R_2$  незалежно являють собою  $(C_1-C_6)$ -алкіл; неароматичний  $(C_3-C_{15})$ карбоциклічний радикал, який необов'язково є заміщеним, причому вказаний замісник(и) не являє собою заміщений карбоніл; аміно $(C_1-C_4)$ алкільну групу, де аміно необов'язково дизаміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл, де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$ ; феніл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_3)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл; дифеніл $(C_1-C_3)$ алкіл; нафтил; антраценіл; насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_3)$ алкілом, гідроксилом або бензилом; 1-адамантилметил; ароматичний гетероцикл, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_5)$ алкокси;  $(C_1-C_3)$ алкіл, заміщений ароматичним гетероциклом, незаміщений або монозаміщений або полізаміщений галогеном,  $(C_1-C_5)$ алкілом або  $(C_1-C_3)$ алкокси; або ще  $R_1$  являє собою водень та  $R_2$  є таким, як визначено вище; або ще  $R_1$  і  $R_2$  утворюють насичений 5-8-членний гетероциклічний радикал з атомом азоту, до якого вони приєднані, вказаний гетероциклічний радикал не являє собою морфолін, якщо  $w_2, w_3, w_4, w_5, w_6, g_2, g_3, g_4, g_5$  і  $g_6$  всі являють собою водень; група  $R_5$  є такою, як визначено вище, якщо  $X$  являє собою  $-(CH_2)_x-N(R_3)-$ ; група  $R_5$ : якщо  $X$  являє собою прямий зв'язок,  $R_5$  являє собою  $(C_1-C_3)$ алкіл;  $(C_3-C_{12})$ циклоалкіл, незаміщений або заміщений  $(C_1-C_5)$ алкілом; феніл $(C_1-C_3)$ алкіл, незаміщений або заміщений галогеном або  $(C_1-C_5)$ алкілом; циклоалкіл $(C_1-C_3)$ алкіл де циклоалкіл являє собою  $C_3-C_{12}$  і є незаміщеним або заміщеним  $(C_1-C_5)$ алкілом; або 2-норборнілметилом;



Дані результати не обмежуються тільки людьми і можуть бути застосовані до ссавців в цілому.

Композиції, які містять антагоніст(и) CB1, можуть вводитися з профілактичною та/або терапевтичною метою. Активний інгредієнт (наприклад, антагоніст(и) рецептора CB1) присутній в фарма-

цевтичній композиції в "ефективній кількості". "Ефективна кількість" фармацевтичної композиції означає достатню, але не токсичну кількість агента для забезпечення бажаного ефекту. Термін означає кількість, достатню для лікування суб'єкта (наприклад, ссавця, особливо людини). Таким чином, термін "терапевтична кількість" означає кількість, достатню для вилікування стану захворювання або симптомів, шляхом запобігання, перешкодження, затримки або обернення прогресу захворювання або будь-яких інших небажаних симптомів. Термін "профілактично ефективна" кількість означає кількість, яку вводять суб'єкту, що ще не має захворювання, і яка являє собою кількість, ефективну для запобігання, перешкодження або затримки початку захворювання.

З метою лікувального застосування композиції вводять пацієнту, який вже страждає на захворювання, як описано вище, в кількості, достатній для вилікування або щонайменше часткової зупинки симптомів захворювання та його ускладнень. Придатні дози фармацевтичної композиції визначаються без проблем у відповідності до будь-якої з кількох добре досліджених схем. Наприклад, дослідження на тваринах (в тому числі, на мишах або щурах) звичайно використовують для визначення максимальної дози біологічно активного агента на кілограм маси тіла, яка переноситься пацієнтом. Загалом щонайменше один з видів тварин, на яких проводять дослідження, належить до ссавців. Результати досліджень на тваринах можуть бути екстрапольовані для визначення доз з метою використання у інших видів, наприклад, таких як людина. Величина ефективної дози також залежить від природи та сили захворювання або стану, а також від загального стану здоров'я пацієнта.

З метою профілактичного застосування композиції, які містять, наприклад, антагоністи рецептора CB1, вводять пацієнту, що є вразливим або іншим чином піддається ризику захворювання печінки. Профілактичну кількість визначають як "профілактично ефективну" кількість або дозу. При такому застосуванні точна кількість залежить від стану здоров'я пацієнта і маси тіла.

При лікувальному і профілактичному застосуванні антагоніст, який міститься в фармацевтичній композиції, можна вводити у вигляді декількох доз або однієї дози до досягнення бажаної відповіді. Типово лікування контролюють і при необхідності здійснюють введення повторних доз. Сполуки за винаходом можуть вводитися у відповідності до існуючих схем лікування кожного разу, коли потрібна інактивація рецепторів CB1.

Добові дози продуктів можуть варіювати у широкому інтервалі від 0,01 до 1000мг для дорослої людини на добу. Переважно композиція містить 0,01, 0,05, 0,1 0,5, 10,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 і 500мг активного інгредієнта для симптоматичної корекції доз у пацієнта, якого лікують. Медикамент типово містить від приблизно 0,01мг до приблизно 500мг активного інгредієнта, переважно від 1мг до приблизно 100мг активного інгредієнта. Ефективна кількість лікарського засобу звичайно вводиться у вигляді доз від 0,0002мг/кг до приблизно 20мг/кг маси тіла на до-



бу, особливо від приблизно 0,001мг/кг до 10мг/кг маси тіла на добу. Однак слід розуміти, що конкретний рівень доз і частота введення для будь-якого конкретного пацієнта можуть варіювати і будуть залежати від численних факторів, в тому числі активності конкретної сполуки, яку використовують, метаболічної стабільності і тривалості дії цієї сполуки, віку, маси тіла, загального стану здоров'я, статі, раціону, способу і часу введення, швидкості екскреції, комбінації лікарських засобів, сили конкретного стану, а також від хазяїна, який отримує лікування.

У фармацевтичних композиціях за винаходом для перорального, сублінгвального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, трансдермального, місцевого або ректального введення активний інгредієнт, окремо або в комбінації з іншим активним інгредієнтом, може вводитися в окремій дозованій формі, як суміш з традиційними фармацевтичними підтримуючими засобами, тваринам або людям. Придатні окремі дозовані форми включають форми для перорального введення, такі як таблетки, гелеві капсули, порошки, гранули та суспензії або розчини для перорального застосування, форми для сублінгвального та букального введення, аерозолі, імпланти, форми для підшкірного, трансдермального, місцевого, внутрішньочеревинного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, підшкірного, трансдермального, інтракального та інтраназального введення, а також форми для ректального введення.

Придатні дозовані форми для введення включають форми для перорального введення, такі як таблетки, желатинові капсули, порошки, гранули та розчини або суспензії для перорального прийому, форми для сублінгвального та букального введення, аерозолі, імпланти, форми для підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, інтраназального або внутрішньоочного введення, а також форми для ректального введення.

У фармацевтичних композиціях за даним винаходом активний інгредієнт загалом введений в дозовані лікарські форми, які містять від 0,5 до 1000мг, переважно від 1 до 500мг, більш переважно від 2 до 200мг вказаного активного інгредієнта на одиницю лікарської форми для щоденного введення.

При виготовленні твердої композиції у формі таблеток до активного інгредієнта, необов'язково мікронізованого, може бути доданий зволожуючий агент, такий як натрію лаурилсульфат, з подальшим змішуванням з фармацевтичним носієм, таким як кремнію оксид, желатин, крохмаль, лактоза, магнію стеарат, тальк, аравійська камедь і т.п. Таблетки можуть бути вкриті сахарозою, різноманітними полімерами або іншими придатними речовинами або ще вони можуть бути оброблені таким чином, щоб здійснювати пролонговану або віддалену дію з метою безперервного виділення попередньо визначеної кількості активного інгредієнта.

Препарат у формі желатинових капсул отримують шляхом змішування активного інгредієнта з розбавлювачем, таким як гліколь або ефіри гліце-

рину і заповнення отриманою сумішшю м'яких або твердих желатинових капсул.

Препарат у формі сиропу або еліксиру може містити активний інгредієнт разом з підсолоджуючим агентом, який переважно не містить калорій, метилпарабеном та пропілпарабеном як антисептиками, ароматизатором і придатним барвником.

Порошки та гранули, що диспергуються у воді, можуть містити активний інгредієнт в суміші з диспергуючими або зволожуючими агентами або суспензуючими агентами, такими як полівінілпіролідон, а також з підсолоджуючими засобами або засобами для корекції смаку.

Ректальне введення здійснюють з використанням супозиторіїв, виготовлених із зв'язуючими речовинами, які плавляться при температурі прямої кишки, наприклад, масло какао або поліетиленгліколь.

Парентеральне, інтраназальне або внутрішньоочне введення здійснюють з використанням водних суспензій, ізотонічних сольових розчинів або стерильних ін'єкційних розчинів, які містять сумісні з фармакологічної точки зору диспергуючі та/або зволожувальні агенти, наприклад, пропіленгліколь, бутіленгліколь або поліетиленгліколь.

Таким чином, співрозчинник, наприклад, спирт, такий як етанол, або гліколь, такий як поліетиленгліколь або пропіленгліколь, і гідрофільна поверхнево-активна речовина, така як Твін 80, може використовуватися для виготовлення ін'єкційного водного розчину для внутрішньовенного введення. Активний інгредієнт може бути солюбілізований за допомогою тригліцериду або естеру гліцерину для виготовлення ін'єкційного масляного розчину для внутрішньом'язового введення.

Трансдермальне введення здійснюють з використанням мультиамінованих пластирів або резервуарів, в яких активний інгредієнт міститься у формі спиртового розчину.

Введення шляхом інгаляції здійснюють шляхом використання аерозолі, який містить, наприклад, сорбітану триолеат або олеїнову кислоту разом з трихлорфторметаном, дихлортетрафторетаном або будь-яким іншим біологічно сумісним газом-пропелентом.

Активний інгредієнт також може бути введений в мікрокапсули або мікросфери, необов'язково з одним або більше носіями або добавками.

Серед форм пролонгованого вивільнення, які є корисними у випадку хронічного лікування, можуть бути використані імпланти. Вони можуть бути виготовлені у формі масляної суспензії або у формі суспензії мікросфер в ізотонічному середовищі.

Активний інгредієнт також може бути представлений у формі комплексу з циклодекстрином, наприклад, альфа-, бета- або гама-циклодекстрин, 2-гідроксипропіл-бета-циклодекстрин або метилбета-циклодекстрин.

Інший придатний антагоніст рецептора CB1 може складатися з антитіла, спрямованого на рецептор CB1, яке перешкоджає зв'язуванню агоністів з рецептором CB1.

Існують різноманітні ізоформи рецепторів CB1 та інші варіанти. Відповідно, застосування антаго-

ністів до будь-якого з цих варіантів рецептора CB1 не буде виходити за межі винаходу. Загалом і на додаток до ідентифікації або гомології послідовності білка біологічна функція рецептора CB1 може бути визначена існуванням сполученого з G білком клітинного рецептора, здатного до зв'язування з ТКГ і перетворення клітинного сигналу. Досвідчений спеціаліст буде здатний тестувати функцію рецептора CB1 за допомогою відомих стандартних методик. Вони можуть включати експресію кДНК уявного CB1 в клітинах CHO, подальше тестування з використанням лігандів CB1 та вимірювання сигнальної активності клітин активованого уявного рецептора CB1, наприклад, шляхом вимірювання продукування циклічного АМФ.

Альтернатива зменшенню перетворення канабіноїдами сигналу через рецептор CB1 за допомогою фармакологічних засобів залучає регуляцію вниз або пригнічення такого рецептора. Існують різноманітні відомі техніки для регуляції вниз або пригнічення експресії генів, які досвідчений спеціаліст в даній галузі буде здатний використовувати. Невичерпний перелік включає інактивацію шляхом гомологічного рекомбінування (Gossen, J. Trends Genet. 9: 27-31, 1993), інтерференції РНК (Elbashir S. M., Nature. 2001 May 24; 411(6836): 428-9), експресію домінантних негативних рецепторів (Dasil, M. et al., Mol. Cell. Biol. 1998 Oct, 18(10): 5981-91) і трансгенну експресію факторів пригнічення транскрипції.

Також можливо здійснити скринінг антагоністів CB1 з селективними протифіброзними властивостями шляхом використання культур міофібробластів, одержаних шляхом надмірного росту експлантатів, виготовлених з хірургічних зразків нормальної печінки людини, як було описано раніше (Li, L. et al., Gastroenterology 125, 460-9 (2003), Davaille J. et al., J. Biol. Chem. (2002)). Конкретно, спосіб скринінгу антагоністів CB1 з селективними протифіброзними властивостями включає наступні стадії:

- а) одержання множинних культур клітин фібробластів,
- б) забезпечення контакту кожної з культур клітин з однією з досліджуваних сполук,
- с) оцінка впливу сполук на фіброгенні властивості міофібробластів шляхом оцінки їхнього впливу на виживання і ріст вказаних клітин,
- д) відбір однієї з досліджуваних сполук.

Альтернативний спосіб є таким, як описано вище, за винятком того, що стадія (с) включає оцінку впливу сполук на фіброгенні властивості міофібробластів, шляхом оцінки їхнього впливу на здатність міофібробластів синтезувати позаклітинний матрикс і компоненти, які інгібують його розкладання.

Альтернативний спосіб є таким, як описано вище, за винятком того, що стадія (с) включає оцінку впливу сполук на фіброгенні властивості міофібробластів, шляхом оцінки продукування та міграції цитокінів.

Досвідчений спеціаліст в даній галузі буде здатний здійснити вказані окремі стадії з використанням добре відомих методик, таких як описані в Li, L. et al., Gastroenterology 125, 460-9 (2003),

Davaille J. et al., J. Biol. Chem. (2002), Li L et al., J. Biol. Chem. 2001 та Davaille, J. et al., J. Biol. Chem. 275, 34628-33 (2000). Сполуки, виділені за допомогою таких способів, далі можуть бути використані для виробництва композиції для лікування захворювань печінки.

#### Приклади

Приклад 1. Регуляція вгору рецепторів CB1 в циротичній печінці людини

#### Матеріали

Використовували середовище культивування і реактиви від Gibco (Invitrogen, Франція). Використовувалася сироватка бичачого плоду від Jbio Laboratories (Франція). Пул АВ-позитивної сироватки людини одержували з Національного Центру переливань. Кроляча антисироватка проти рецептора CB1 (вироблена проти залишків 1-14 рецептора CB1 людини) і CB1 блокуючий пептид (залишки 1-14 рецептора CB1 людини) були одержані від Cayman (Spibio, Франція).

#### Одержання РНК та RT-ПЛР

Загальну РНК екстрагували з нерухомих клітин в планшетах 100мм з використанням набору RNeasy (Qiagen, Франція). кДНК синтезували з 2мкг загальної РНК шляхом зворотної транскрипції протягом 1год. при 37°C з використанням 200 одиниць зворотної транскриптази M-MLV (Invitrogen, Франція) в 20мкл реакційної суміші, яка містить 0,05мкг/мл оліго(dT) 12-18 праймерів (Invitrogen, Франція), 0,5мМ дезоксинуклеозиду трифосфату (dNTP) (Promega, Франція) і 10мМ дітіотретіолу в буфері для синтезу першого ланцюга (first strand buffer, Invitrogen, Франція). Для перевірки щодо можливого забруднення геномною ДНК проводили контрольний дослід за таких же умов, але без зворотної транскриптази. ПЛР здійснювали з 2мкл реакційної суміші зворотної транскриптази з використанням 1,25 одиниць ДНК полімерази AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Франція) і відповідного буфера з додаванням 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2мМ дезоксинуклеозиду трифосфату (dNTP) та 25пмоль кожного праймера в загальному об'ємі 50мкл. 40 циклів ПЛР проводили в термічному пристрої для керування циклами (thermocycler) GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, Франція), кожний цикл складався з денатурації при 95°C протягом 45сек., відпалювання при 58°C протягом 45сек. та подовження при 72°C протягом 30сек., де перший цикл включає подовжений період денатурації (10хв.) для активації полімерази та останній цикл включає подовжений період елонгації (10хв.). Олігонуклеотидні праймери (MWG Biotech, Франція) для CB1 були наступними, смисловий праймер CB1 5'-TTTGGCTACACAATTGGAAGTCTAAGAACCC-3' та антисмисловий праймер CB1 5'-GCACACATTGACACGTATCCACTGCTTG-3', з передбачуваним продуктом ПЛР в 287 базових пар (bp). ПЛР-ампліфіковані продукти аналізували на 1,5% гелі агарози і здійснюють блотинг на мембрані Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Франція). Після попередньої гібридизації в буфері, який містить 6XSSC, 5мМ EDTA, pH8, 5X DENHARDT, 0,1% SDS та 0,1мг/мл одноланцюгової ДНК протягом 2год. при 42°C, мембрану гібридували протягом ночі при 42°C в такому ж бу-

фері, який містить 50нг зонда олігонуклеотиду CB1 5'-CCTGTGAGATGTGTATCAGTGTATGTGC-3', міченого [ $\gamma$ - $^{32}$ P] аденозину трифосфатом, з використанням T4 кінази (Invitrogen, Франція). Після гібридизації пляму (blot) двічі промивали в 0,1% SDS, 1XSSC протягом 30хв. при кімнатній температурі і аналізували за допомогою фосфоримування зображень (Molecular Dynamics, Франція).

#### Зразок печінки людини

Ретроспективно досліджували швидко заморожені зразки, одержані в результаті резекції від 13 пацієнтів (8 чоловіків, 5 жінок, середній вік 55 років, від 39 до 72 років). Нормальні зразки печінки відбирали у 3 жінок, у яких здійснювали резекцію печінки з приводу колоно-ректальних метастазів (n=3). Циротичні зразки були одержані з печінки 8 пацієнтів, у яких проводили трансплантацію печінки і від 2 пацієнтів, у яких проводили резекцію печінки з приводу гепатоцелюлярної карциноми. Цироз був наслідком хронічного гепатиту С (n=1) або гепатиту В (n=2) інфекції, первинний біліарний цироз (n=1), алкогольне захворювання печінки (n=4) або хвороби Вілсона (n=1) і залишалися криптогенними в 1 випадку.

Імуногістохімічне визначення рецепторів CB1 в нормальній і циротичній печінці

Заморожені секції (5-7мкм) висушували у повітрі і фіксували в льодяно холодному ацетоні протягом 10 хвилин при -20°C. Неспецифічне зв'язування блокували попереднім інкубуванням зрізів протягом 1год. при кімнатній температурі з 20% сироватки людини в 50мМ трис(tris)-буферизованого сольового розчину (ТБС) pH7,6. Зрізи додатково інкубували протягом ночі при 4°C з кролячою поліклональною антисироваткою до рецептора CB1 людини (Cauman, Spibio, Франція), розбавленим 1/2000 в розбавлювачі антитіл (Dakopatts Франція). Після триразового промивання ТБС зрізи інкубували протягом 45хв. при кімнатній температурі з мишачим моноклональним антикролячим антитілом до імуноглобуліну G (Dakopatts, Франція), розбавленим 1/50, тричі промивали ТБС, додатково інкубували протягом 30хв. при кімнатній температурі з кролячими антимишачими імуноглобуліновими антитілами (Dakopatts, Франція), розбавленими 1/50 і далі обробляли з використанням лужної фосфатази-антилужної фосфатази (ЛФАЛФ) комплексу імуноферментним методом, як описано в публікації Li, L. et al., Gastroenterology 125, 460-9 (2003). Для підтвердження специфічності первинного антитіла контроль включав попередню адсорбцію первинного антитіла з відповідним синтетичним пептидом (100мкг/мл протягом 1год. при кімнатній температурі) або опущенням первинного антитіла. З метою визначення того, чи експресують печінкові міофібробласти білок CB1, здійснюють подвійне імунозabarвлення CB1 та  $\alpha$ -актину гладких м'язів. Спочатку зрізи обробляли для імунозabarвлення CB1 з використанням стандартного трьохстадійного біотин-стрептавідин імунопероксидазного методу. Якщо коротко, ендогенну пероксидазу гасять інкубацією фіксованих в ацетоні зрізів в ТБС/0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> протягом 30хв., потім промивають ТБС. Не-

специфічне зв'язування блокують попереднім інкубуванням зрізів протягом 30хв. з ТБС і 20% сироватки людини. Далі зрізи інкубували протягом 15хв. в авідині з наступним інкубуванням протягом 15хв. в біотині (Vector Laboratories, блокуючий набір Авідин/Біотин) і додатково інкубували протягом ночі при 4°C з анти-CB1 антисироваткою. Далі зрізи промивали в ТБС і послідовно інкубували з вторинним біотинілізованим козячим анти-кролячим антитілом (Dakopatts, Франція) (1/500) і комплексом "стрептавідин-пероксидаза хрому" (Pierce, Perbio, Interchim, Франція), по 30хв. з кожним. Активність пероксидази виявляли з використанням підсиленого металом субстрату діамінобензидину (ДАБ) (Pierce, Interchim, Франція). Всі стадії здійснювали при кімнатній температурі, якщо не вказано інше. Імунозabarвлення  $\alpha$ -актину гладких м'язів далі здійснювали з використанням ЛФАЛФ методу, описаного вище, з розбавленням 1/5000 моноклонального антитіла до  $\alpha$ -актину гладких м'язів (Sigma, Франція). Здійснювали протилежне забарвлення зрізів гематоксиліном (counterstained). Одинарне і подвійне забарвлення візуалізували за допомогою мікрофотографії світлих полів на мікроскопі Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Німеччина), обладнаному цифровою системою зображення (Hamamatsu 3CCD кольорова камера, Hamamatsu Photonics, Франція).

Виділення і культивування печінкових міофібробластів людини

Печінкові міофібробласти людини одержували шляхом розростання експлантатів, одержаних з хірургічних зразків нормальної печінки, одержаних в процесі хірургічних втручань з приводу доброякісних або злоякісних пухлин печінки, як описано в Davaille, J. et al., J. Biol. Chem. 275, 34628-33 (2000). Клітини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (МДСІ), яке містить 10% сироватки (5% сироватки бичагого плоду і 5% сироватки людини, МДСІ 5/5) і використовували між третім і сьомим пасажом. Експерименти здійснювали на клітинах, які робили нерухомими шляхом 48-годинної інкубації у вільному від сироватки середовищі Веймауса (Weymouth), якщо не вказано інше. Міофібробластну природу цих клітин оцінювали, як описано в Davaille, J. et al., J. Biol. Chem. 275, 34628-33 (2000), і вони демонстрували фенотипові і функціональні характеристики фіброгенних клітин, виявлених in situ в процесі печінкового фіброгенезу (Win, K. M. et al., Hepatology 18, 137-45 (1993)). Виявлено, що культури експресують  $\alpha$ -актин гладких м'язів і два маркери печінкових міофібробластів, фібулін-2 і інтерлейкін-6 (Davaille, J. et al., J. Biol. Chem. 275, 34628-33 (2000)).

Імуноцитохімічне визначення рецепторів CB1 в культивованих печінкових міофібробластах людини

Печінкові фібробласти людини засівали (10000/см<sup>2</sup>) в планшети 35мм та вирощували в середовищі з вмістом сироватки протягом 24год., в середовищі, позбавленому сироватки, протягом 48год., промивали ТБС і фіксували в 4% параформальдегіді протягом 10хв. Після одноразового промивання ТБС клітини інкубували в ТБС з вмістом 20% сироватки людини протягом 30хв. при

кімнатній температурі і додатково інкубували з анти-SB1 антисироваткою (1/500 розведення в ТБС/20% сироватці людини) протягом 3 год. при кімнатній температурі і протягом ночі при 4°C у вологій камері. Далі клітини рясно промивали ТБС, інкубували з Су3-кон'югованим антикролячим IgG (Sigma, Франція) (розведення 1/50 в ТБС/20% сироватки людини) при кімнатній температурі, в темному місці протягом 30 хв., промивали, вкривали середовищем для заливання VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA) і досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопу. Для підтвердження специфічності первинного антитіла контроль включав попередню адсорбцію з відповідним синтетичним пептидом (100 мкг/мл протягом 1 год. при кімнатній температурі) або видалення первинного антитіла.

Експресію рецептора SB1 досліджували за допомогою імунохімії з поліклональним антитілом, спрямованим проти рецептора SB1 людини, на заморожених зрізах тканини, одержаних з хірургічних зразків нормальної (n=3) і циротичної (n=10) печінки з різною етіологією (хронічний гепатит С n=1 або хронічний гепатит В n=2, первинний біліарний цироз n=1, алкогольне захворювання печінки n=4 або хвороба Вілсона n=1 і залишився криптогенним в одному випадку). В нормальній печінці дискретну, точкову імунореактивність SB1 визначала повздовж синусоїдальних стінок. В циротичній печінці загальна інтенсивність імунозабарвлення SB1 була помітно збільшена, незалежно від етіології цирозу. SB1 був найбільш очевидним в численних клітинах витягнутої форми, розташованих повздовж фіброзних перетинок. Експресія рецептора SB1 була також виявлено в інших непаренхімальних клітинах, в тому числі запальних клітинах та протокових проліферуючих клітинах, розташованих повздовж фіброзних перетинок. Специфічність антитіла демонстрували за відсутністю сигналу в зрізах, інкубованих в присутності блокуючого SB1 пептиду або за відсутності першого антитіла.

Подвійний імуногістохімічний аналіз з використанням антитіла проти рецептора SB1 та антитіла проти  $\alpha$ -актину гладких м'язів чітко виявив печінкові міофібробласти всередині фіброзних перетинок як тип клітин, що очевидно експресують рецептори SB1. Відповідно, рецептори SB1 також експресувалися в культивованих печінкових міофібробластах людини, що було продемонстровано за допомогою аналізу RT-ПЛР та імуноцитохімії.

Приклад 2. Зменшення фіброгенної реакції у SB1-дефіцитних мишей

Тварини і дизайн дослідження

Самців мишей CD1 з недіючими рецепторами SB1 та їх одноплодних сородичів дикого типу одержували, як було описано раніше в публікації Ledent, C. et al., Science 283, 401-4. (1999). Гетерозиготних мишей виводили протягом більш ніж 15 поколінь на фоні CD1 перед тим, як одержати мишей дикого типу і мутантних мишей для даного дослідження. Використовували 40 самців: дикого типу (n=20) і SB1-/- (n=20) віком 8-10 тижнів. Тварин розділяли на наступні групи: миші дикого типу, контроль (оливкова олія, n=8); миші дикого типу,

CCl<sub>4</sub> (n=12); SB1-/-, контроль (оливкова олія, n=5); SB1-/-, CCl<sub>4</sub> (n=15). Тварин утримували в кімнатах з контрольованою температурою та вологістю, утримували з 12-годинним циклом світла/темряви і забезпечували необмежений доступ до води та їжі, якщо не вказано інше. Фіброз індукували введенням тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St Quentin-Fallavier, Франція), змішаного з оливковою олією (1:10 об./об.) в кількості 0,5 мл/кг маси тіла, шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції двічі на тиждень, що чергували з рівним об'ємом етанолу, змішаного з Кремофором (Cremophor) і фосфатного буферного розчину (5/5/90) тричі на тиждень. Контрольні тварини в групі CCl<sub>4</sub> одержували оливкову олію. Після проходження 4 тижнів тварини голодували протягом ночі, після чого їх забивали через 48 год. після останньої ін'єкції CCl<sub>4</sub>. Зразки печінки відбирали з кількох часток та здійснювали одне з наступного: i) швидко заморожували в рідкому азоті та гомогенізували в розчині для екстракції РНК, ii) гомогенізували в H<sub>2</sub>O та швидко заморожували в рідкому азоті для визначення гідроксипроліну або iii) фіксували в буферизованому формаліні. Швидко заморожені зразки до використання зберігали при -80°C. Зразки крові також збирали в силіконізовані пробірки, які містили бар'єр з інертного гелю та диск активатора згортання (Venoject, Terumo, Франція), сироватку відокремлювали центрифугуванням і зберігали до використання при -20°C.

Аналізи функції печінки

Рутинні аналізи функції печінки (білірубін, лужна фосфатаза і аспартаттрансаминаза) здійснювали на зразках крові за допомогою автоматичного аналізатора.

Фіброз, запалення та оцінка некрозу

Зразок крові фіксували в 10% формаліні та заливали парафіном. Зрізи тканини (товщиною 4 мкм) забарвлювали гематоксилином-еозином (H&E) для рутинного дослідження або Пікро-Сіріус (Picro-Sirius) червоним для візуалізації відкладення печінкового колагену. Гістологічні зміни (некроз та запальна інфільтрація) та організацію (фіброз) оцінювали всліпу щонайменше на 4 фрагментах з різних областей кожної печінки, оцінку здійснював незалежний патологоанатом. Фіброз оцінювали по шкалі від 0 до 4 у відповідності до напівкількісної модифікованої системи балів METAVIR, наступним чином: відсутність фіброзу = 0, портальний фіброз без перетинок = 1, декілька перетинок = 2, численні перетинки без цирозу = 3 і цироз = 4. Гетерогенність фіброзу в печінці, якщо вона присутня, брали до уваги при оцінці відсотка площини, який відповідає окремому рівню балів в кожному фрагменті, а також при об'єднанні даних для кожної печінки. Некроз, який визначали за ацидофільними тільцями, балонною дегенерацією та/або розсіяними вогнищами гепатоцелюлярного некрозу, оцінювали наступним чином: відсутній = 0, легкий = 1 (залучення 1/3 часток або вузли), помірний (залучення 1/3-2/3 часток або вузли) = 2, виражений (залучення більш, ніж 2/3 часток або вузли) = 3. Запальну інфільтрацію оцінювали від 0 до 3; відсутність = 0, легка (портальна та/або лобулярна) запальна інфільтрація в менш, ніж 1/3 часточок або вузлів = 1,

помірна (портальна або лобулярна) запальна інфільтрація із залученням 1/3-2/3 часток або вузлів =2, виражена (портальна та/або лобулярна) запальна інфільтрація із залученням більш ніж 2/3 часток або вузлів =3. Всі зразки оцінювали одночасно.

Вміст гідроксипроліну

Вміст гідроксипроліну оцінювали, як було описано раніше в публікації Grenard, P. et al., J. Hepatol. 26, 1356-62. (1997). Три маленьких фрагмента кожної печінки поєднували, гомогенізували у воді дистильованій, ліофілізували та гідролізували протягом ночі в 6N HCl при 110°C (10мг порошку сухої печінки на 1мл 6N HCl). Далі гідролізати обробляли активованим вугіллям, фільтрували, випарювали та повторно суспендували у воді дистильованій. Аліквоти гідролізатів застосовували для спектрофотометричного вимірювання вмісту гідроксипроліну (HP) шляхом реакції з реактивом Ерліха (Ehrlich) у відповідності до методу Весснера (Woessner, J. F., Arch. Biochem. Biophys. 93, 440-7 (1961)), модифікованого як описано в публікації Creemers, L. B. et al., Biotechniques 22, 656-8 (1997). Вміст гідроксипроліну в печінці виражали якмкг на мг тканини (суха вага).

Виділення та культивування печінкових фібробластів миші

Фібробласти миші виділяли шляхом перфузії колагенази та очищували за допомогою градієнта щільності в Nicodenz, як описано в Vrochides, D., et al., Hepatology, 1996. 23(6): p.1650-5. Після виділення клітини культивували в середовищі МДСІ з вмістом 20% сироватки бичачого плоду. На перший день уламки клітин та не приєднані клітини видаляли промиванням і клітини далі культивували в середовищі МДСІ з вмістом 10% сироватки бичачого плоду. Використовували клітини між третім і дев'ятим пасажем та було виявлено, що вони експресують альфа-актин гладких м'язів, фібулін-2 та інтерлейкін-6.

Вимірювання каспаза-3-подібної активності

Проби апоптозу здійснювали на незлитих клітинах, яким дозволяли прикріпитися протягом ночі в середовищі МДСІ з вмістом 10% сироватки бичачого плоду і позбавляли сироватки на вказаний час. Каспаза-3-подібну активність аналізували на лізатах клітин з використанням AC-DEVD-AFC як субстрату, як було описано раніше (Davaile, J., et al., J. Biol. Chem., 2002. 277(40): p.37323-30; Li, L., et al., J. Biol. Chem., 2001. 276 (41): p.38152-8).

Оцінка життєздатності клітин

Печінковим фібробластам миші (7000клітин/комірку в 96-коміркових пластинах) дозволяли прикріпитися протягом ночі в МДСІ 10%, позбавляти сироватки на визначений час. В кожну комірку додавали реактив CellTiter 96 Aqueous One Solution і реєстрували поглинання при 490nm.

Визначення печінкового TGF-β1

Вміст TGF-β1 в печінці визначали в активованих кислотою гомогенатах цілісної печінки. Заморозжені зразки печінки гомогенізували в лізисному буфері (25mM HEPES pH7,4, 1% NP40, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,3mM EDTA, 1mM етиленглікольтетраоцтової кислоти (EGTA), інгібітори фосфатази і протеази) протягом 30хв. при 4°C. Після центрифугування

при 12000g протягом 10хв. при 4°C, очищені лізати тканини збирали і зберігали до використання при -80°C. Концентрацію білка визначали за допомогою IBCA Protein Assay (Pierce) з використанням альбуміни бичачої сироватки (АБС) як стандарту. Для активації латентного TGF-β1 до імунореакційноздатної форми лізату тканини підкислювали в рівному об'ємі 2,5N оцтової кислоти, 10M сечовини при кімнатній температурі протягом 10хв. з наступною нейтралізацією з використанням 2,7M NaOH в 1M HEPES. Здійснювали пробу ELISA з використанням мишачого TGF-β1 Quantikine (R&D Systems, Франція) за інструкцією виробника. Мишачий TGF-β1 рекомбінантний білок використовували як стандарт. Результати виражали як кількість пг TGF-β1 на 1мг розчинного білка.

Імуногістохімічне забарвлення α-актину гладких м'язів

Тканину печінки фіксували у формаліні та фіксували в парафіні. Імуногістохімічне забарвлення α-актину гладких м'язів здійснювали з використанням набору імунодетектування Vector M.O.M. у відповідності до протоколу, описаного виробником (Vector Laboratories). Якщо коротко, фіксовані в парафіні зрізи депарафінізували та регідратували крізь ксилен та етанол в ТБС (50mM Трис, 150mM NaCl, pH7,6). Зрізи в цитратному буфері двічі по 5хв. обробляли мікрохвилями потужністю 700Вт. Далі активність ендогенної пероксидази гасили інкубуванням протягом 1год. в 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ТБС. Після блокування здійснювали неспецифічне зв'язування попереднім інкубуванням зрізів з 1,5% конячою сироваткою в ТБС протягом 1год., зрізи інкубували протягом 15хв. в авідині і далі протягом 15хв. в біотині (блокуючий набір Avidin/Biotin, Vector Laboratories), після чого інкубували з блокуючим розчином мишачого імуноглобуліну MOM протягом 1год. Далі зрізи промивали ТБС і послідовно інкубували з розчином для розбавлення MOM протягом 5хв. з розведенням моноклонального антитіла проти α-актину гладких м'язів (Sigma, Франція) 1:1000 протягом 30хв., з реактивом MOM біотинілізованого анти-мишачого IgG протягом 10хв. і в кінці з реактивом Vectastain ABC протягом 5хв. Активність пероксидази визначали з використанням підсиленого металом субстрату діамінобензидину (DAB) (Pierce Interchim, Франція). Всі стадії здійснювали при кімнатній температурі. Контрольні зрізи забарвлювали розбавлювачем MOM замість первинного антитіла не демонстрували позитивного забарвлення. Область позитивного забарвлення вимірювали на 4-5 фрагментах печінки на тварину з використанням системи морфометричного аналізу за допомогою програмного забезпечення Image-Pro Plus (MediaCybernetics, MicroMechanique, Франція).

Статистична обробка

Результати виражені як середнє значення± стандартна помилка середнього для n експериментів. Результати аналізували шляхом двобічного аналізу розбіжностей (ANOVA) з наступними спареними порівняннями, коригованими у відповідності до методу Ст'юдента-Ньюмана-Келза (Student-Newmann-Keuls). p<0,05 приймали як мінімальний рівень значущості.

CB1 рецептор-дефіцитні миші (CB1<sup>-/-</sup>) та їхні однопіплідні родичі дикого типу (WT) піддавали хронічній обробці CCl<sub>4</sub>. Контрольні миші (CB1<sup>-/-</sup> і WT) одержували оливкову олію. Середня маса

тіла, маса печінки і співвідношення маса печінки/маса тіла в чотирьох експериментальних групах значною мірою не відрізнялися (табл.1).

Таблиця 1

Показники життєдіяльності і результати аналізів функції печінки у мишей дикого типу (WT) або CB1-дефіцитних мишей після 4 тижнів обробки CCl<sub>4</sub>

Параметр	Дикий тип Оливкова олія	Дикий тип CCl <sub>4</sub>	CB1 <sup>-/-</sup> Оливкова олія	CB1 <sup>-/-</sup> -CCl <sub>4</sub>
Маса тіла (г)	36,3±1,7	35,2±0,8	34,8±2,1	36,6±0,9
Маса печінки (г)	1,9±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	2,1±0,1
Співвідношення "маса печінки/маса тіла" (×100)	5,26±0,45	6,0±0,3	5,4±0,4	5,7±0,1
Аспартаттрансаміназа (МО/л)	94,7±9,2	1887,2±656,6*	139,6±24,3	1341,9±457,1 <sup>#</sup>
Лужна фосфатаза (МО/л)	37,9±5,9	55,0±6,2*	33,6±2,0	56,4±4,6*
Загальний білірубін	3,5±1,0	15,1±4,2*	3,6±0,9	10,0±3,4*

Результати наведені як середнє значення± стандартна помилка середнього.

\* P<0,05 проти групи мишей дикого типу, які одержували оливкову олію;

<sup>#</sup>P<0,05 проти мишей CB1<sup>-/-</sup>, які одержували оливкову олію

У мишей дикого типу фіброз печінки розвивався після 4 тижнів обробки CCl<sub>4</sub>, як показано гістологічним аналізом зрізів тканин печінки, забарвлених Пікро-Сіріус червоним. Печінки оброблених CCl<sub>4</sub> мишей дикого типу демонстрували утворення численних перетинок з певною кількістю вузлів. Оброблені CCl<sub>4</sub> миші CB1<sup>-/-</sup> демонстрували більше слабку фіброгенну реакцію із зменшеним утворенням фіброзних перетинок. Відповідно, бали фіброзу були значно нижчими у оброблених CCl<sub>4</sub> мишей CB1<sup>-/-</sup> в порівнянні з групою оброблених CCl<sub>4</sub> мишей дикого типу (2,59±0,13 та 3,33±0,13мг/мг, відповідно; p<0,05). Більше того, вміст колагену в печінці, оцінений за визначення гідроксипроліну в печінці, був істотно знижений (на 40%) у CB1-дефіцитних мишей, оброблених CCl<sub>4</sub>, в порівнянні з тваринами дикого типу (0,45±0,06 та 0,73±0,11мг/мг тканини (суха вага), відповідно; p<0,05). Кінець кінцем, вираженість некрозу і запалення значно не відрізнялася у оброблених CCl<sub>4</sub> мишей дикого типу і CB1<sup>-/-</sup> дефіцитних мишей, як показано в табл.2.

Таблиця 2

Некроз і запалення у мишей дикого типу (WT) і CB1<sup>-/-</sup> мишей після 4 тижнів обробки CCl<sub>4</sub>

Параметр	Дикий тип CCl <sub>4</sub>	CB1 <sup>-/-</sup> CCl <sub>4</sub>
Некроз	1,3±0,3	1,3±0,2
Запалення	1,4±0,3	1,5±0,2

Результати наведені як середнє значення± стандартна помилка середнього.

Вимірювали вміст в печінці фіброгенного цитокіну TGF-β1 і оцінювали експресію α-актину гладких м'язів, як маркера печінкових міофібробластів та активованих зіркоподібних клітин печінки. У ви-

падку тварин, оброблених CCl<sub>4</sub>, продукування TGF-β1 у CB1-дефіцитних мишей було зменшено в порівнянні з тваринами дикого типу (Фіг.1А). Крім того, α-актин гладких м'язів був істотною мірою розріджений у оброблених CCl<sub>4</sub> мишей CB1<sup>-/-</sup> в порівнянні з обробленими CCl<sub>4</sub> тваринами дикого типу (1,23±0,09 против 2,58±0,23; p<0,05) (Фіг.1В).

Кінець кінцем, з метою оцінки того, чи зменшує інактивація CB1 накопичення печінкових міофібробластів шляхом зменшення їхньої проліферації та/або шляхом апоптозу, використовували ізольовані печінкові міофібробласти мишей дикого типу і CB1-дефіцитних мишей. Як стимул апоптозу використовували позбавлення сироватки. Позбавлення сироватки суттєво впливає на життєздатність печінкових міофібробластів, виділених у мишей дикого типу (WT) (Фіг.2). Навпаки, позбавлення сироватки спричиняє цитотоксичний вплив на печінкові міофібробласти, виділені з CB1<sup>-/-</sup> тварин, що продемонстровано округленням, усадкою та від'єднанням клітин, а також зменшенням життєздатності (Фіг.2А). Позбавлення сироватки також підсилює стимуляцію каспаза-3-подібної активності в клітинах CB1<sup>-/-</sup> в порівнянні з клітинами мишей дикого типу (Фіг.2В). Таким чином, печінкові міофібробласти з мишей CB1<sup>-/-</sup> демонстрували більш високу частоту апоптозу, ніж клітини мишей дикого типу.

Одержані результати демонструють, що позбавлення рецепторів CB1 сенситивізує печінкові міофібробласти до апоптозу.

Приклад 3. Щоденне куріння коноплі являє собою фактор ризику прогресування фіброзу при хронічному гепатиті С

Були включені 195 не відібраних наївних пацієнтів з відомим станом споживання коноплі (dated exposure) (чоловіки/жінки 140/55, вік 42±10). Збирали дані щодо споживання коноплі, алкоголю і тютюну в ході захворювання, вік інфікування, стать, шлях зараження, генотип, біомедичні дослідження (BMI), стеатозу, активності і фіброзу

(METAVIR), а також швидкості прогресування фіброзу (середнє значення становило 0,08 на рік).

Шляхом одномірного аналізу було визначено швидкість прогресування фіброзу, яка перевищувала 0,08/рік, була пов'язана з курінням коноплі, як показано в табл.3, споживанням алкоголю >30г/день (64%,  $p=0,03$ ), помірним або вираженим стеатозом (65%,  $p=0,004$ ), віком інфікування >25 (63%,  $p<0,01$ ) і гістологічною активністю >A2 (65%,  $p<0,001$ ). В мультиваріантному аналізі швидкість прогресування >0,08 була незалежно пов'язана з щоденним курінням коноплі (OR=3,8; 95% довірчий інтервал (1,7-8,7)), споживанням алкоголю >30г/день (OR=2,1; 95% довірчий інтервал (1,0-4,6)), віком зараження >25 (OR=4,0; 95% довірчий інтервал (1,9-8,4)), та активністю >A2 (OR=7,5; 95% довірчий інтервал (3,5-16,1)). Таким чином, існує причинний зв'язок між щоденним споживанням коноплі та прогресуванням фіброзу.

Таблиця 3

Зустрічальність споживання коноплі при прогресуванні фіброзу

Конопля	Швидкість прогресування фіброзу більше 0,08/рік	P
Ніколи, n=102 (52%)	43 (42%)	0,029
Іноді, n=30 (16%)	15 (50%)	
Щоденно, n=63 (32%)	40 (63%)	

Приклад 4. Культивування печінкових міофібробластів в присутності антагоністів рецептора CB1

Виділення та культивування печінкових міофібробластів людини

Печінкові фібробласти людини були одержані шляхом розростання експлантів, одержаних з хірургічних зразків нормальної печінки, одержаних в результаті хірургічних втручань з приводу доброякісних і злоякісних пухлин печінки, як було описано раніше. Вказану методику здійснювали у відповідності до етичних норм, встановлених законодавством Франції. Клітини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (МДСІ) з вмістом 10% сироватки (5% сироватки бичачого плоду і 5% сироватки людини, МДСІ 5/5) та використовували між третім і сьомим перевиванням. Експерименти проводили на клітинах, які робили нерухомими шляхом інкубування протягом 48год. у вільному від сироватки середовищі Веймауса (Waimouth), якщо не вказано інше.

Виділення та культивування печінкових міофібробластів мишей

Міофібробласти мишей виділяли шляхом перфузії колагенази та очищували шляхом градієнта щільності в Nicodenz, як було описано вище. Після виділення клітини культивували в середовищі МДСІ з вмістом 20% сироватки бичачого плоду. В перший день уламки клітин і незакріплені клітини видаляли промиванням і клітини далі культивували в середовищі МДСІ з вмістом 10% сиро-

ватки бичачого плоду. Клітини використовували між третім і дев'ятим пасажем.

Проби апоптозу

Проби апоптозу здійснювали на незлитих клітинах, яким дозволяли прикріпитися протягом ночі в МДСІ 5/5 і позбавляли сироватки на 48год., як описано в Davaille J. et al., J. Biol. Chem. 2002; 277:37323-30, та Li L et al., J. Biol. Chem. 2001; 276: 38152-8. Морфологію ядер оцінювали з використанням забарвлення DAPI, каспаза-3-подібну активність оцінювали на лізатах клітин з використанням AC-DEVD-AFC як субстрату та фрагментування (laddering) ДНК оцінювали шляхом електрофорезу в агарозному гелі загальної ДНК, екстрагованої з використанням набору Apoptotic DNA Ladder Kit.

Життєздатність клітин

Клітинам (7000 клітин/комірку в 96-коміркових пластинах) дозволяли прикріпитися протягом ночі в МДСІ 5/5, позбавляли сироватки на 48год. в МДСІ без фенольного червоного і обробляли вказаними ефекторами протягом 16год. В кожному комірку додавали реактив CellTiter 96 Aqueous One Solution і реєстрували поглинання при 490nm.

Вимірювання синтезу ДНК

Синтез ДНК вимірювали в потрібному повторенні у комірках шляхом інкорпорації  $^{[3H]}$ тимідину, як було описано раніше (Tao, J. et al., J. Biol. Chem., 1999. 274 (34): p.23761-23769). Злиті печінкові міофібробласти людини позбавляли сироватки на 48год. і далі стимулювали протягом 30год. 20нг/мл PDGF-BB. Злиті печінкові міофібробласти мишей позбавляли сироватки на 24год. в присутності 0,1% BSA і далі стимулювали протягом 30год. за допомогою 20нг/мл PDGF-BB в присутності 0,01% BSA.  $^{[3H]}$ Тимідин (0,5мкКі/комірку) додавали протягом останніх 20год. інкубації.

Культивування клітин здійснювали, як описано в Прикладі 1 даного опису. Забезпечували контакт культур клітин печінкових міофібробластів людини і миші з підвищеними дозами антагоніста рецептора CB1 SR141716 та вимірювали синтез ДНК печінковими міофібробластами.

У печінкових міофібробластах людини SR141716 залежним від дози чином інгібував синтез ДНК, спричинений 20нг/мл PDGF-BB (Фіг.3А), причому 50% максимального інгібування було досягнуто в присутності 300-400нМ сполуки.

SR141716 також інгібував синтез ДНК, спричинений 20нг/мл PDGF-BB у міофібробластах миші, виділених з мишей дикого типу; при цьому він тільки незначно впливав на проліферацію клітин мишей CB1-/- (Фіг.3В).

Одержані результати демонструють, що антагоніст CB1 SR141716 спричиняє інгібування росту печінкових міофібробластів людини і миші, здійснюючи свою дію через рецептори CB1.

Приклад 5. Оцінка лікувального впливу SR141716 на індукований фіброз печінки

Оцінювали антифіброгенний потенціал антагоніста CB1 SR141716 на експериментальній моделі фіброзу печінки, індукованого хронічною інтоксикацією тетрахлоридом вуглецю.

Введення лікарського засобу

SR141716 (10мг/кг маси тіла) розчиняли безпосередньо перед використанням в розчині носія (2 краплі Твіну 80 в 10мл ФБР, який містить 10% диметилсульфоксиду і 5% етанолу) та обробляли ультразвуком.

#### Тварини та дизайн експерименту

Мишей CD1 одержували від Janvier (Франція). Всі експерименти здійснювали з використанням затверджених директив з етики. Використовували 36 самців віком 10-12 тижнів, тварин розділяли на наступні групи: лікована розчинником група, яка одержувала оливкову олію (n=3); лікована розчинником група, яка одержувала CCl<sub>4</sub> (n=14); лікована SR141716 група, яка одержувала оливкову олію (n=3); лікована SR14-1716A група, яка одержувала CCl<sub>4</sub> (n=16). Тварин утримували в кімнатах з контрольованою температурою та вологістю, утримували з 12-годинним циклом світла/темряви і необмеженим доступом до води та їжі, якщо не вказано інше. Фіброз індукували введенням тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St. Quentin-Fallavier, Франція), змішаного з оливковою олією (1:10об./об.) в кількості 0,5мл/кг маси тіла, шляхом внутрішньочеревинних ін'єкцій, які здійснювали двічі на тиждень протягом місяця. SR141716 або розчинник вводили щоденно за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції. Лікування розпочинали за 7 днів до ін'єкції тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) і продовжували протягом всього періоду введення CCl<sub>4</sub>.

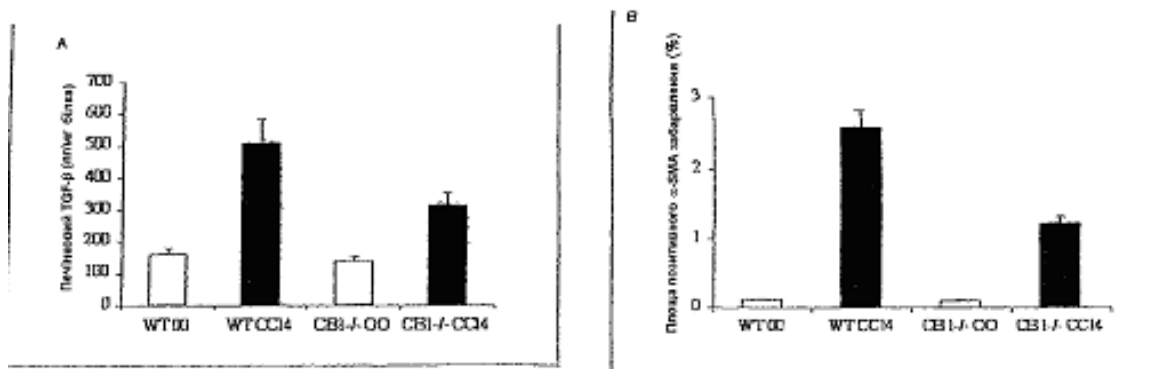
Однчасне введення CCl<sub>4</sub> з носієм (ФБР, який містить 10% ДМСО, 5% етанолу, 0,1% Твіну 80) спричиняв масову загибель тварин, яка досягала 50% популяції після проходження 1 місяця (див. Фіг.4). Навпаки, введення мишам CCl<sub>4</sub> одночасно з 10мг/кг SR141716 асоціювалося з підвищеною виживаністю через 1 місяць (83%). В контрольних групах, лікованих розчинником або SR141716, випадків загибелі тварин не спостерігалось.

Таким чином, одержані результати показують гепатопротекторну роль антагоніста CB1 SR141716.

Приклад 6. Оцінка оптимального режиму перорального введення SR141716 в лікуванні фіброзу печінки

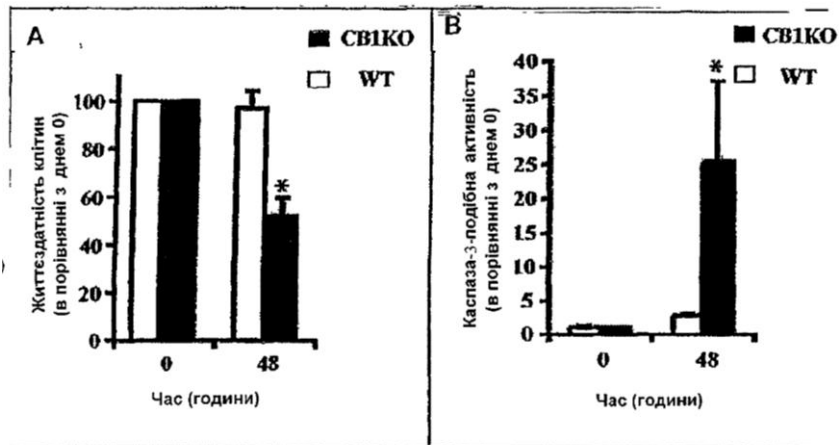
З метою визначення оптимальних умов довгострокового лікування SR141716 було здійснено наступне.

40 самців мишей CD1 розділили на наступні групи: контроль (оливкова олія, n=3); CCl<sub>4</sub> (n=12); лікована SR141716 контрольна група (оливкова олія, n=3); 2 групи лікованих SR141716 тварин, які одержували CCl<sub>4</sub> (n=двічі по 12). Тварин утримували в кімнатах з контрольованою температурою та вологістю з 12-годинним циклом світла/темряви і необмеженим доступом до води та їжі, якщо не вказано інше. Фіброз індукували введенням тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) (Sigma, St. Quentin-Fallavier, Франція), змішаного з оливковою олією (1:10об./об.) в кількості 0,5мл/кг маси тіла, шляхом внутрішньочеревинних ін'єкцій, які здійснювали двічі на тиждень. Контрольні тварини замість CCl<sub>4</sub> одержували оливкову олію. SR141716 включали в раціон мишей RM1 (DIETEX, Франція) в концентрації 65мг/кг і, таким чином, вводили групі SR141716. Було здійснено припущення, що миша вагою 30г буде споживати 5г на день, тобто передбачувана кінцева спожита доза SR141716 становитиме 10мг/кг. Лікування SR141716 розпочинали за 7 днів до ін'єкції тетраклориду вуглецю (CCl<sub>4</sub>) (12 мишей) або через 7 днів після першої ін'єкції (12 мишей) і продовжували протягом всього курсу введення CCl<sub>4</sub>. Після проходження 5 тижнів тварини голодували протягом ночі та їх забивали через 48год. після останньої ін'єкції CCl<sub>4</sub>. Відбирали зразки печінки з кількох часток та здійснювали одне з наступного: i) швидко заморожували в рідкому азоті та гомогенізували в розчині для екстракції РНК, ii) гомогенізували в H<sub>2</sub>O та швидко заморожували в рідкому азоті для визначення гідроксипроліну або iii) фіксували в буферизованому формаліні. Швидко заморожені зразки до використання зберігали при -80°C. Зразки крові також збирали в силіконізовані пробірки, які містили бар'єр з інертного гелю та диск активатора згортання (Venoject, Terumo, Франція), сироватку відокремлювали центрифугуванням і зберігали до використання при -20°C. Результати використовували для оцінки концентрації, при якій токсичність є прийнятною з терапевтичної точки зору.

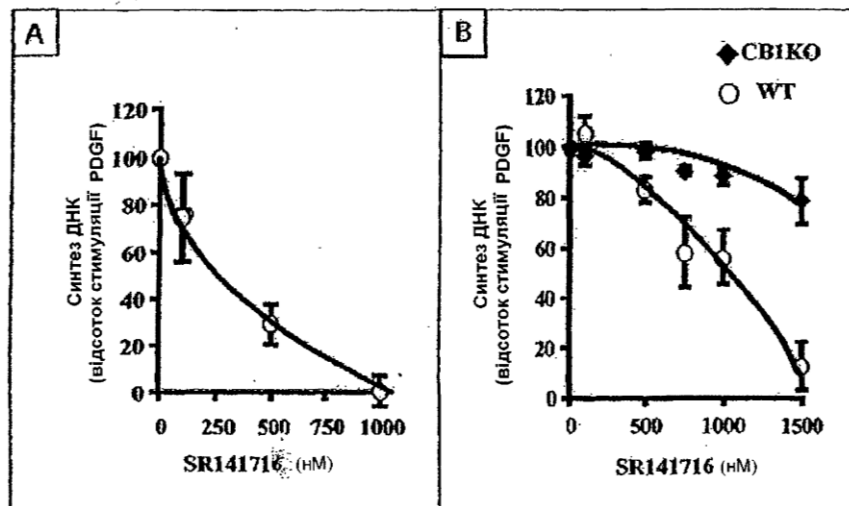


Фіг. 1

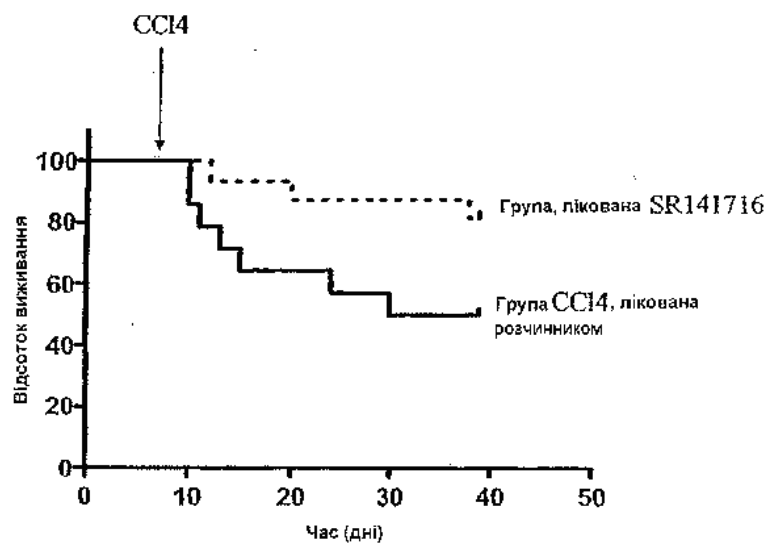




Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; INSERM

SANOFI-AVENTIS

<120> ЗАСТОСУВАННЯ АНТАГОНІСТІВ РЕЦЕПТОРА СВ1 ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КОМПОЗИЦІЇ,  
КОРИСНОЇ В ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАНЬ ПЕЧІНКИ

&lt;130&gt; CB1

&lt;150&gt; EP04290633

&lt;151&gt; 2004-03-09

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 472

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 1

Met	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Thr	Ile
1				5					10					15	

Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Tyr	Val	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr	Glu	Asp
			20					25					30		

Ile	Lys	Gly	Asp	Met	Ala	Ser	Lys	Leu	Gly	Tyr	Phe	Pro	Gln	Lys	Phe
		35					40					45			

Pro	Leu	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Glu	Lys	Met	Thr	Ala
	50					55					60				

Gly Asp Asn Pro Gln Leu Val Pro Ala Asp Gln Val Asn Ile Thr Glu  
65 70 75 80

Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ser Ser Phe Lys Glu Asn Glu Glu Asn Ile  
85 90 95

Gln Cys Gly Glu Asn Phe Met Asp Ile Glu Cys Phe Met Val Leu Asn  
100 105 110

Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser Leu Thr Leu Gly Thr  
115 120 125

Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys Val Ile Leu His Ser  
130 135 140

Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro Ser Tyr His Phe Ile Gly Ser Leu Ala  
145 150 155 160

Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser Val Ile Phe Val Tyr Ser Phe Ile Asp  
165 170 175

Phe His Val Phe His Arg Lys Asp Ser Arg Asn Val Phe Leu Phe Lys  
180 185 190

Leu Gly Gly Val Thr Ala Ser Phe Thr Ala Ser Val Gly Ser Leu Phe  
195 200 205

Leu Thr Ala Ile Asp Arg Tyr Ile Ser Ile His Arg Pro Leu Ala Tyr  
210 215 220

Lys Arg Ile Val Thr Arg Pro Lys Ala Val Val Ala Phe Cys Leu Met  
225 230 235 240

Trp Thr Ile Ala Ile Val Ile Ala Val Leu Pro Leu Leu Gly Trp Asn  
245 250 255

Cys Glu Lys Leu Gln Ser Val Cys Ser Asp Ile Phe Pro His Ile Asp  
260 265 270

Glu Thr Tyr Leu Met Phe Trp Ile Gly Val Thr Ser Val Leu Leu Leu  
275 280 285

Phe Ile Val Tyr Ala Tyr Met Tyr Ile Leu Trp Lys Ala His Ser His  
290 295 300

Ala Val Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile Ile Ile His  
305 310 315 320

Thr Ser Glu Asp Gly Lys Val Gln Val Thr Arg Pro Asp Gln Ala Arg  
325 330 335

Met Asp Ile Arg Leu Ala Lys Thr Leu Val Leu Ile Leu Val Val Leu  
340 345 350

Ile Ile Cys Trp Gly Pro Leu Leu Ala Ile Met Val Tyr Asp Val Phe  
355 360 365

Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile Lys Thr Val Phe Ala Phe Cys Ser Met  
370 375 380

Leu Cys Leu Leu Asn Ser Thr Val Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Leu Arg  
385 390 395 400

Ser Lys Asp Leu Arg His Ala Phe Arg Ser Met Phe Pro Ser Cys Glu  
405 410 415

Gly Thr Ala Gln Pro Leu Asp Asn Ser Met Gly Asp Ser Asp Cys Leu  
420 425 430

His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala Ala Glu Ser  
435 440 445

Cys Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile Ala Lys Val Thr Met Ser Val Ser  
450 455 460

Thr Asp Thr Ser Ala Glu Ala Leu  
465 470

<210> 2

<211> 411

<212> PRT

<213> Людина

<400> 2

Met Ala Leu Gln Ile Pro Pro Ser Ala Pro Ser Pro Leu Thr Ser Cys  
1 5 10 15

Thr Trp Ala Gln Met Thr Phe Ser Thr Lys Thr Ser Lys Glu Asn Glu  
 20 25 30  
 Glu Asn Ile Gln Cys Gly Glu Asn Phe Met Asp Ile Glu Cys Phe Met  
 35 40 45  
 Val Leu Asn Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser Leu Thr  
 50 55 60  
 Leu Gly Thr Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys Val Ile  
 65 70 75 80  
 Leu His Ser Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro Ser Tyr His Phe Ile Gly  
 85 90 95  
 Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser Val Ile Phe Val Tyr Ser  
 100 105 110  
 Phe Ile Asp Phe His Val Phe His Arg Lys Asp Ser Arg Asn Val Phe  
 115 120 125  
 Leu Phe Lys Leu Gly Gly Val Thr Ala Ser Phe Thr Ala Ser Val Gly  
 130 135 140  
 Ser Leu Phe Leu Thr Ala Ile Asp Arg Tyr Ile Ser Ile His Arg Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Tyr Lys Arg Ile Val Thr Arg Pro Lys Ala Val Val Ala Phe  
 165 170 175  
 Cys Leu Met Trp Thr Ile Ala Ile Val Ile Ala Val Leu Pro Leu Leu  
 180 185 190  
 Gly Trp Asn Cys Glu Lys Leu Gln Ser Val Cys Ser Asp Ile Phe Pro  
 195 200 205  
 His Ile Asp Glu Thr Tyr Leu Met Phe Trp Ile Gly Val Thr Ser Val  
 210 215 220  
 Leu Leu Leu Phe Ile Val Tyr Ala Tyr Met Tyr Ile Leu Trp Lys Ala  
 225 230 235 240  
 His Ser His Ala Val Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile  
 245 250 255

Ile Ile His Thr Ser Glu Asp Gly Lys Val Gln Val Thr Arg Pro Asp  
260 265 270

Gln Ala Arg Met Asp Ile Arg Leu Ala Lys Thr Leu Val Leu Ile Leu  
275 280 285

Val Val Leu Ile Ile Cys Trp Gly Pro Leu Leu Ala Ile Met Val Tyr  
290 295 300

Asp Val Phe Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile Lys Thr Val Phe Ala Phe  
305 310 315 320

Cys Ser Met Leu Cys Leu Leu Asn Ser Thr Val Asn Pro Ile Ile Tyr  
325 330 335

Ala Leu Arg Ser Lys Asp Leu Arg His Ala Phe Arg Ser Met Phe Pro  
340 345 350

Ser Cys Glu Gly Thr Ala Gln Pro Leu Asp Asn Ser Met Gly Asp Ser  
355 360 365

Asp Cys Leu His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala  
370 375 380

Ala Glu Ser Cys Ile Lys Ser Thr Val Lys Ile Ala Lys Val Thr Met  
385 390 395 400

Ser Val Ser Thr Asp Thr Ser Ala Glu Ala Leu  
405 410

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Людина

<400> 3

Phe Arg Thr Ile Thr Thr Asp Leu Leu Tyr Val Gly Ser Asn Asp Ile  
1 5 10 15

Gln Tyr Glu Asp  
20

45

94025

46

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 4

Asp Met Ala Ser Lys Leu Gly Tyr Phe Pro Gln Lys Phe Pro Leu Thr  
1 5 10 15

Ser Phe Arg Gly Ser Pro Phe  
20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 5

Thr Glu Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ser Ser Phe Lys Glu Asn Glu Glu  
1 5 10 15

Asn Ile Gln Cys  
20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 6

Arg Met Ile Gln Arg Gly Thr Gln Lys Ser Ile Ile Ile His Thr Ser  
1 5 10 15

Glu Asp Gly Lys  
20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 7

Val Tyr Asp Val Phe Gly Lys Met Asn Lys Leu Ile  
 1 5 10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 8

His Lys His Ala Asn Asn Ala Ala Ser Val His Arg Ala Ala Glu Ser  
 1 5 10 15

Cys Ile Lys Ser  
 20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Людина

&lt;400&gt; 9

His Lys His Ala Asn Asn Thr Ala Ser Met His Arg Ala Ala Glu Ser  
 1 5 10 15

Cys Ile Lys Ser  
 20