

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年11月2日 (02.11.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/207398 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 31/496* (2006.01) *A61K 31/4965* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01) *A61P 31/06* (2006.01)  
*A61K 31/4409* (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/081772

(22) 国际申请日: 2023年3月16日 (16.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202210463752.6 2022年4月29日 (29.04.2022) CN

(71) 申请人: 首都医科大学附属北京胸科医院  
(**BEIJING CHEST HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。北京市结核病胸部肿瘤研究所(**BEIJING TUBERCULOSIS CHEST CANCER INSTITUTE**) [CN/CN]; 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。

(72) 发明人: 陆宇 (**LU, Yu**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。陈效友(**CHEN, Xiaoyou**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。祁雪婷(**QI, Xueting**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。郑璐瑶(**ZHENG, Luyao**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。付雷(**FU, Lei**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。张炜焱(**ZHANG, Weiyan**);

中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。王宁(**WANG, Ning**); 中国北京市通州区北关大街9号院, Beijing 101149 (CN)。

(74) 代理人: 北京华科联合专利事务所(普通合伙)  
(**BEIJING HUAKE UNION PATENT OFFICE**); 中国北京市朝阳区农展馆南路5号京朝大厦1号楼三层3017室, Beijing 100125 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: USE OF ANTI-IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS DRUG NINTEDANIB IN TREATMENT OF TUBERCULOSIS

(54) 发明名称: 一种抗特发性肺纤维化药物尼达尼布在结核病治疗中的应用

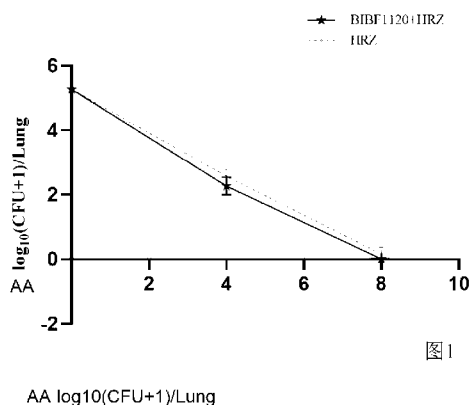


图1

(57) Abstract: Provided is use of nintedanib or a pharmaceutically acceptable salt thereof in preparing a drug for the treatment of tuberculosis. The nintedanib or the pharmaceutically acceptable salt thereof is used in combination with other anti-tuberculosis drugs for the treatment of tuberculosis, or used as an adjuvant drug for the treatment of tuberculosis, wherein the other anti-tuberculosis drugs are selected from: rifampicin, isoniazide, pyrazinamide, ethambutol, fluoroquinolone, streptomycin, kanamycin, amikacin, capreomycin, sodium aminosaliclylate, ethionamide, cycloserine, clofazimine, and linezolid.

(57) 摘要: 尼达尼布或其药用盐在制备治疗结核病的药物中的应用, 所述尼达尼布或其药用盐和其他抗结核药物联合使用以治疗结核病, 或者作为治疗结核病的辅助药物使用, 其中所述其他抗结核药物选自: 利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、氟喹诺酮类、链霉素、卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素、对氨基水杨酸钠、乙硫异烟胺、环丝氨酸、氯法齐明、利奈唑胺。

WO 2023/207398 A1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 说明书

## 一种抗特发性肺纤维化药物尼达尼布在结核病治疗中的应用

## 技术领域：

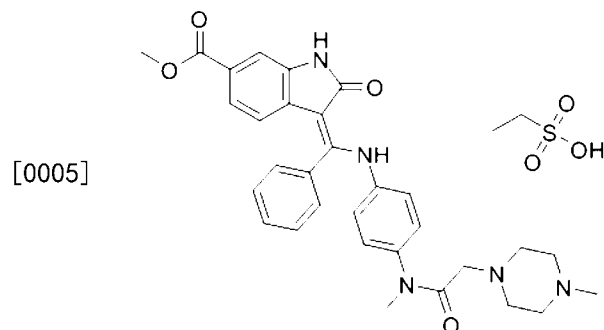
[0001] 本发明涉及一种药物新用途，特别涉及尼达尼布在制备治疗结核病的药物中的应用。

## 背景技术：

[0002] 结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (MTB) 感染引起的一种慢性传染性疾病，至今仍是造成死亡人数最多的单一传染病。结核分枝杆菌感染通常导致以肉芽肿性炎、肺实质的破坏以及间质纤维化为特征的病变。现有的化疗方案存在疗程长、副作用多，效果不佳等问题。尽管标准的抗结核治疗方案对药物敏感性结核病高度有效，可达到微生物学治愈，但在治疗后超过2/3的患者会引起广泛的肺部结构改变，超过一半以上的人存在永久性肺功能损伤。肺结核继发性纤维化是常见的肺结核后肺病 (pulmonary impairment after TB, PIAT)，广泛肺纤维化不仅严重影响患者的肺功能，同时结核菌被纤维包裹导致药物难以完全杀灭细菌容易复发。

[0003] 结核分枝杆菌与人类免疫系统共同进化，通过多种途径在感染细胞内持续存在，引起宿主严重的病理及组织损伤，进而降低了现有抗生素的治疗疗效，以及利于耐药性的产生。这些迫切需要应对结核分枝杆菌感染的新治疗手段及药物组合方案。宿主导向治疗 (host-directed therapy, HDT) 是抗感染领域中的新兴治疗方法，是一种新的有效的结核病的辅助治疗方法。HDT方法可以 (1) 增强抗生素的作用，(2) 缩短TB的治疗持续时间，(3) 防止复发，(4) 改善免疫病理，包括与TB相关的基质破坏和纤维化，而纤维化会干扰抗结核药物的渗透和疗效。几项研究表明，肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 和白细胞介素 $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 等细胞因子介导了纤维化的发展，并可能导致晚期慢性结核病患者的呼吸衰竭。该数据强调了针对胶原沉积和纤维化形成的HDT方法的需要。

[0004] 尼达尼布 (Nintedanib, BIBF1120) 是一种强效酪氨酸激酶细胞内抑制剂，临床用其乙基磺酸盐，结构式如下：



[0006] 目前上市的尼达尼布乙基磺酸盐为软胶囊制剂，临床上用于治疗特发性肺纤维化 (IPF)。目前研究认为转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) - $\beta$ 、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在纤维化疾病进程中均起着重要作用。可抑制涉及纤维化发病机制的多种信

号传导受体,包括血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)。尼达尼布抑制PDGFR、FGFR和VEGFR,从而限制从受损ECM中释放的促纤维化介质的作用。尼达尼布可能具有减少纤维化和肉芽肿血管生成的双重有益作用,因为其作为VEGFR抑制剂发挥作用。

[0007] 迄今为止,尚未见有国内外将尼达尼布用于结核病治疗的相关报道。

[0008] 本发明在有关研究中,发现尼达尼布可以用于结核病的治疗。

## 发明内容

[0009] 为此,本发明提供尼达尼布或其药用盐单独或者和其他抗结核药物联合在制备治疗结核病的药物中的应用。

[0010] 本发明所述的应用,其中尼达尼布药用盐为尼达尼布乙基磺酸盐。

[0011] 本发明所述结核病,是由结核分枝杆菌感染而引起的传染病,发生于肺部的结核,为肺结核,发生于肺部以外的结核,为肺外结核。

[0012] 本发明所述的应用,其中所述药物单独或者和其他抗结核药物联合使用以治疗结核病,或者作为治疗结核病的辅助药物使用。

[0013] 本发明所述的应用,其中所述其他抗结核病药物选自:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、氟喹诺酮类、链霉素、氟喹诺酮类、卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素、对氨基水杨酸钠、乙硫异烟胺、环丝氨酸、氯法齐明、利奈唑胺。

[0014] 本发明所述的应用,其中所述联合应用包括三种或三种以上的药物联合使用,或者将三种或三种以上的药物制备成复方药物制剂。

[0015] 本发明所述的应用,其中所述的尼达尼布乙基磺酸盐的用法用量为:50-300mg/d;口服,每日1-3次给药。

[0016] 本发明所述的应用,其中用于结核病治疗最少为4-6个月的治疗疗程。

[0017] 本发明的另一个目的在于提供一种由尼达尼布和其他抗结核药物组成的药物组合物,具体由尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼、利福平、吡嗪酰胺四种药物混合制备而成。

[0018] 本发明通过体外和小鼠结核病模型中分析和评价,意外的发现本发明的尼达尼布具有治疗结核病的作用。本发明在进一步的实验中发现,尼达尼布乙基磺酸盐和利福平联合,或者尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼(H),利福平(R),吡嗪酰胺联合用药的联合具有协同增效作用。

[0019] 为此,优选的,本发明提供一种尼达尼布乙基磺酸盐和利福平联合应用,或者尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼(H),利福平(R),吡嗪酰胺联合用药的联合以治疗结核病,所述联合应用,包括两者同时服用,或先后服用,服用量为各自的有效剂量,如服用尼达尼布乙基磺酸盐150mg,利福平450mg-600mg,每日1次。如果是尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼(H),利福平(R),吡嗪酰胺(Z)联合用药的联合应用,可以各自按照规范的给药方法用药。

[0020] 为达用药方便,本发明进一步提供尼达尼布乙基磺酸盐和利福平作为药物活性成份制备而成的复方药物制剂,所述复方药物制剂可以是任何可以口服的制剂形式,如片剂,胶囊,颗粒剂等,也可以是软胶囊剂型。在单位剂量的制剂中,两者含量均为各自的有效剂量,如每片片剂中含有尼达尼布乙基磺酸盐50-300mg,利福平50-300mg。优选每片片剂中含有尼达尼布乙基磺酸盐150mg,利福平450mg-600mg。

- [0021] 本发明还提供尼达尼布的相关实验效果。
- [0022] 本发明相对于现有的结核病药物治疗,具有以下优点:
- [0023] ①新颖:国内外尚未见相关报道;
- [0024] ②首次发现尼达尼布具有抗结核活性;
- [0025] ③疗程缩短:敏感结核有望缩短至4-5月;
- [0026] ④疗效好:与现有方案的疗效相当;
- [0027] ⑤复发率低:与现有方案比较,复发率更低。

## 附图说明

- [0028] 图1,不同时间点肺组织各治疗组肺组织中CFU计数结果
- [0029] 图2,不同时间点各治疗组羟脯氨酸(HYP)含量
- [0030] 图3,治疗4W肺泡炎症评分,治疗8W肺泡炎症评分
- [0031] 图4,Masson染色结果:BIBF1120+HRZ治疗组与HRZ治疗组
- [0032] 图5,Masson染色阳性面积占比
- [0033] 图6,各治疗组特殊染色阳性占比
- [0034] 图7,免疫组化结果显示BIBF1120+HRZ治疗组相较于HRZ治疗组CD31表达量降低

## 具体实施方式

[0035] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细描述,但所述内容是对本发明的解释而不是限定。

[0036] 实验例1尼达尼布对结核分枝杆菌的体外活性

[0037] 将H37Rv菌株培养至对数生长期,7H9液体培养基稀释菌悬液至 $1 \times 10^6$ CFU/ml备用。如下图所示:A-F行依次为阳性/阴性对照孔、INH、RFP、PFD、SC1011、BIBF1120。取96孔板依次将各含药孔倍比稀释。37℃培养7d后,各孔加入20 $\mu$ l的阿尔玛蓝和12.5 $\mu$ l的20%吐温-80,37℃继续培养24h,记录各孔颜色,蓝色表示菌株无生长,红色表示有菌生长,MIC表示由蓝色变为红色的最低药物浓度。重复试验3次。结果显示:尼达尼布具有抑菌活性,对H37Rv标准株的MIC值为:24.567ug/ml。

[0038] 实验例2:尼达尼布对抗结核药物利福平的作用

[0039] 采用微量肉汤稀释法测定药物抑制90%的结核分枝杆菌生长时的最低药物浓度(MIC90),然后以各药单独应用时的MIC值为基础,采用二倍稀释法将BIBF1120和RFP稀释为6个浓度,由 $2 \times \text{MIC}-1/16 \times \text{MIC}$ 。向96孔板中第2列分别加入50 $\mu$ l  $2 \times \text{MIC}-1/16 \times \text{MIC}$  A液(BIBF1120),第2-7行的前7孔分别加入50 $\mu$ l  $2 \times \text{MIC}-1/16 \times \text{MIC}$  B液(RFP),向各单药MIC测定孔中加入50 $\mu$ l 7H9,最后将100 $\mu$ l稀释好的菌悬液加至96孔板的每个孔中,并设置阳性对照孔(100 $\mu$ l稀释菌液+100 $\mu$ l 7H9)和阴性对照孔(200 $\mu$ l 7H9)。通过观察96孔板中颜色的变化(颜色从蓝色变为紫色或者粉红色,表示有菌生长;蓝色,表示由于药物的抑制而没有菌生长)来确定药物联合应用中单药的MIC。组合作用是由FICI确定的, $\text{FICI} = (\text{MICA联合}/\text{MICA单独}) + (\text{MICB联合}/\text{MICB单独})$ ,MICA单独和MICB单独分别表示A药和B药单独作用于结核分枝杆菌时的MIC,MICA联合和MICB联合分别表示A药和B药联合应用后,达到与药物单用时相同药效所对应的A药和B药的MIC。当 $\text{FICI} \leq 0.5$ 时,两药为协同作用;当 $0.5 < \text{FICI} < 1$ 时,两

药为部分协同作用;当FICI=1时,两药为相加作用;当1<FICI<4时,两药为无关作用,当FICI>4时,两药为拮抗作用。结果显示:两药组合显示出抑菌活性。

[0040] 实验例3:不同浓度尼达尼布在巨噬细胞内杀菌活性

[0041] 采用巨噬细胞胞内杀菌活性评估BIBF1120单药及BIBF1120+RFP组合用药的抗结核活性。具体操作方法如下:收集J774A.1巨噬细胞至50ml离心管中,取100ul的巨噬细胞和900ul的细胞培养基,加入到1.5ml无菌离心管中进行10倍比稀释。显微镜下计数。将巨噬细胞稀释到 $4 \times 10^5$ 个/ml,轻柔的铺在48孔透明微孔板内,每孔1ml。铺板完成后放入37℃,5%CO2培养箱中培养,培养24h。MOI=5:1及 $2 \times 10^6$ CFU/MLH37Rv与巨噬细胞共培养。4h后用无菌PBS清洗2次,去除胞外结核分枝杆菌,在加入新的RPMI细胞培养基。放入37℃5%CO2培养箱中,培养72h。3天后弃去48孔版中的RPMI,加入200ul 0.1%SDS,培养箱中放置5-10min,每孔加入800ul细胞培养基,混匀。细胞裂解后每孔取100ul进行10,100,1000,100000倍稀释,并取100ul接种在7H10固体培养基上,使用涂布器涂匀,三周后进行CFU计数。

[0042] 表1,BIBF1120单药胞内杀菌活性结果

[0043]

	菌落计数 (CFU)	菌落计数 (log10CFU)
空白对照	2400000	6.380
RFP (2ug/ml)	502500	5.701
BIBF1120 (50ug/ml)	1077500	6.032
BIBF1120 (25ug/ml)	1462500	6.165
BIBF1120 (12.5ug/ml)	2400000	6.380

[0044] 表2,BIBF1120+RFP组合在巨噬细胞内杀菌活性结果

[0045]

	菌落计数 (CFU)	菌落计数 (log10CFU)
空白对照	4600000	6.663
RFP (2ug/ml)	202500	5.306
BIBF1120 (25ug/ml)	2750000	6.439
RFP (2ug/ml) +BIBF1120 (25ug/ml)	48500	4.686
RFP (2ug/ml) +BIBF1120 (25ug/ml)	61500	4.789

[0046] 结论:巨噬细胞内实验可见在安全给药浓度下,BIBF1120联用抗结核药物RFP可见有增效杀菌的作用。BIBF1120在25ug/ml给药计量时(近似于体外MIC实验结果)单独给药未见明显的抑菌作用

[0047] 实验例4:在小鼠结核病模型中尼达尼布的作用

[0048] 将处于对数生长期的H37Rv菌株以20ml 1×PBS稀释至菌浓度为 $1 \times 10^7$ CFU/ml,将6-8周龄的雌性C57BL/6小鼠气溶胶下感染。建立气溶胶感染慢性小鼠结核病模型,用该模型评价各治疗组的抗菌活性。在感染后第10天(D-32)随机取3只小鼠处死,给药治疗当天(D0)随机取6只小鼠处死,解剖取脾、肺组织匀浆后在7H10板上进行脾、肺菌落(CFU)计数,以确定感染初始及治疗开始时小鼠肺部及脾脏结核分枝杆菌的基线数量。感染6周后开始给药,于给药4周、8周后随机分别取各治疗组7-8只小鼠处死解剖,取脾、肺组织匀浆后在7H10板上进行脾、肺菌落(CFU)计数。治疗8周停药12周后观察各治疗组7只小鼠肺部及脾脏结核分枝杆菌的复发情况C57BL/6小鼠感染6周后随机分为3组(见表3)

[0049] 表3,各治疗组不同时间点肺组织CFU计数结果

[0050]	组别	对照组	HRZ+吡非尼酮	HRZ+BIBF1120	HRZ
	治疗时间				
	D-32	4.38±0.09			
	D0	5.27±0.066			
	4W		2.52±0.23	2.27±0.24	2.57±0.18
	8W		0.30 (2/3)	0	0.39±0.09(3/5)
	W8+12W		6/7	2/7	5/7

[0051] 表4,各治疗组不同时间点脾脏中CFU计数结果

[0052]	组别	对照组	HRZ+吡非尼酮	HRZ+BIBF1120	HRZ
	治疗时间				
	D-32	2.15±0.11			
	D0	3.496±0.257			
	4W		1.82±0.08	1.54±0.10	1.79±0.17

[0053]	8W		0	0	0
	W8+12W		5/7	1/7	5/7

[0054] 注释:异烟肼(H);利福平(R);吡嗪酰胺(Z);D-32:感染10天;W4:治疗4周;W8:治疗8周;W8+12W:治疗8周后停药12W观察复发。D:天;W:周异烟肼:10mg/kg/d;利福平:10mg/kg/d;吡嗪酰胺:150mg/kg/d;吡非尼酮PFD:100mg/kg/d;BIBF1120:50mg/kg/d;其中RFP与其他药物最少间隔1h给药

[0055] 结论:

[0056] 1、BIBF1120+HRZ治疗组与HRZ治疗组在给药4周、8周均有显著的杀菌效果。其中BIBF1120在给药8周后达到脾脏、肺脏无菌化,另外BIBF1120的添加可能缩短肺结核的治疗时间提前达到无菌化。

[0057] 2、BIBF1120+HRZ治疗组相较于HRZ治疗组可降低小鼠复发率。

[0058] 实验例5:

[0059] 使用HYP检测试剂盒进行测定。测定右肺组织中羟脯氨酸含量。将新鲜的肺组织解剖分离,称重,置于试管中,准确加水解液1ml。水浴锅中水浴20min。调节PH为6.0-6.8左右。然后加蒸馏水至10ml,取4ml稀释的水解液加入适量的活性炭。3500r/min离心10min,取上清液1mlzuo检测。空白管和标准管分别表示蒸馏水和标准品。按说明书依次添加各试剂。最后采用酶标仪在550nm处蒸馏水调零,测各管吸光度A值。用下列公式计算HYP含量(ug/mg湿重) = (A测-A空) / (A标-A空) \* 5ug/ml (标准管含量) \* [10 (水解液总体积) / 肺组织湿重]。A测:测定管吸光度;A空:空白管吸光度;A标:标准管吸光度。空白管吸光度;A标:标准管吸光度。

[0060] 表5,各治疗时间点肺组织Hyp含量

[0061]	Control	HRZ	HRZ+BIBF1120
--------	---------	-----	--------------

	D0	362.99ug/mg		
	D4W		636.141	363.891
			524.829	345.454
			505.488	378.183
[0062]	平均值		555.486±57.58	362.509±13.39
	D8W		907.965	588.994
			743.676	526.047
			866.896	611.289
	平均值		839.512±69.810	575.443±36.095

[0063] HE染色结果分析

[0064] 肺组织病理学观察:取小鼠左肺组织进行修剪,经4%多聚甲醛固定,固定状态良好后,经生理盐水洗净后于4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制作3μm石蜡切片,HE染色观察肺组织病理改变,光镜下观察肺组织病理改变,描述炎症浸润程度并行肺损伤病理评分。采用4项指标评估肺损伤程度:①肺泡充血;②肺泡出血;③肺泡间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集;④肺泡间隔增厚。评分标准:无损伤记0分,轻度损伤记1分,中度损伤记2分,重度损伤记3分,各项评分的总和即为肺损伤病理评分。

[0065] 表6,治疗4W肺泡炎症评分

[0066]	病变 编号	肺泡充血	肺泡出血	肺泡间隙 或血管壁 中性粒细胞 浸润或 聚集	肺泡间隔 增厚	肺损伤病 理评分
		10.114W-BIBF 5F	0	0	1	0
	10.114W-BIBF 6F	0	2	0	0	2
	10.114W-BIBF 7F	1	1	0	0	2

	10.114W-HRZ 肺 5F	0	1	1	2	4
[0067]	10.114W-HRZ 肺 6F	0	1	1	2	3
	10.114W-HRZ 肺 7F	0	1	1	1	3

[0068] 表7,治疗8W肺泡炎症评分

编号	病变	肺泡充血	肺泡出血	肺泡间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集	肺泡间隔增厚	肺损伤病理评分
	[0069]	B-1 肺	0	1	1	0
	B-2 肺	0	1	1	1	3
	B-3 肺	0	1	0	0	1
	H-1 肺	0	1	1	2	4
	H-2 肺	0	0	1	2	3
	H-3 肺	0	1	1	2	4

[0070] Masson染色按照试剂盒说明书中的方法进行。切片常规脱蜡至水,Masson A液浸泡过夜,Masson B液与Masson C液等比例混合浸泡1min,Masson D液浸泡6min,Masson E液1min,Masson F液2-30s,1%冰醋酸漂洗分化,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固,普通光学显微镜观察。结果判读胶原纤维呈蓝色;肌纤维、纤维素和红细胞呈红色。采用成像系统采集组织染色切片上的图像,利用分析软件自动读取组织测量区域,计算测量区域中的阳性面积以及组织面积,并计算出阳性面积占比,见图5,6。

[0071] 取冰冻切片复温后,用PBS缓冲液清洗3次,加入柠檬酸钠。待切片自然冷却并清洗后,滴加5%封闭用山羊血清室温封闭切片2h。封闭完成后,滴加抗CD31抗体于4℃孵育过夜,抗体浓度为1:200。第2天滴加生物素标记二抗,室温孵育1h,洗涤3次,滴加辣根酶标记的链霉卵白工作液,37℃孵育15min,用DAB显色,苏木精复染、封片,用生物显微镜拍片记录,见图7,免疫组化结果显示BIBF1120+HRZ治疗组相较于HRZ治疗组CD31表达量降低;初步可以推测BIBF1120的辅助抗结核治疗作用有可能是通过抑制异常血管增生,增加小分子化合物(抗结核药物)递送发挥更好的抗结核活性。

## 权 利 要 求 书

1. 尼达尼布或其药用盐单独或者和其他抗结核药物联合在制备治疗结核病的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其中尼达尼布药用盐为尼达尼布乙基磺酸盐。
3. 根据权利要求1所述的应用,其中所述结核病,为肺结核或肺外结核。
4. 根据权利要求1所述的应用,其中所述结核病为肺结核。
5. 根据权利要求1所述的应用,其中所述尼达尼布或其药用盐单独或者和其他抗结核药物联合使用以治疗结核病,或者作为治疗结核病的辅助药物使用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其中所述其他抗结核药物选自:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、氟喹诺酮类、链霉素、氟喹诺酮类、卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素、对氨基水杨酸钠、乙硫异烟胺、环丝氨酸、氯法齐明、利奈唑胺。
7. 根据权利要求6所述的应用,其中所述联合应用包括三种或三种以上的药物联合使用,或者将三种或三种以上的药物制备成复方药物制剂。
8. 根据权利要求7所述的应用,其中所述复方药物制剂为尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼、利福平、吡嗪酰胺四种药物混合制备而成的复方药物制剂。
9. 根据权利要求1所述的应用,其中所述的尼达尼布乙基磺酸盐的用法用量为:50-300mg/d;口服,每日1-3次给药,用于结核病治疗最少为4-6个月的治疗疗程。
10. 一种由尼达尼布和其他抗结核药物组成的药物组合物,其特征在于,由尼达尼布乙基磺酸盐和异烟肼、利福平、吡嗪酰胺四种药物混合制备而成。

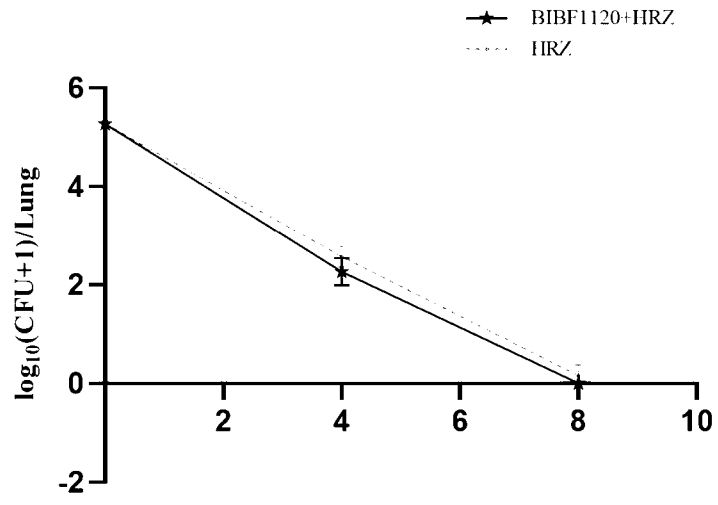


图1

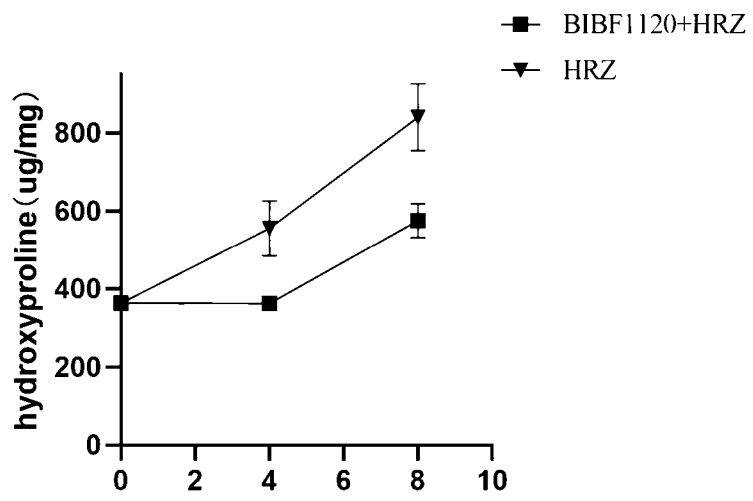
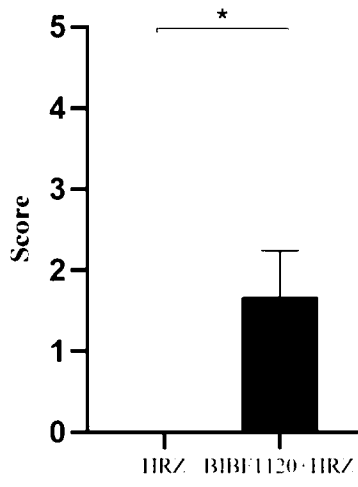
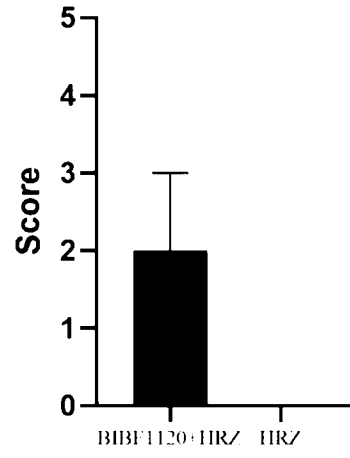


图2

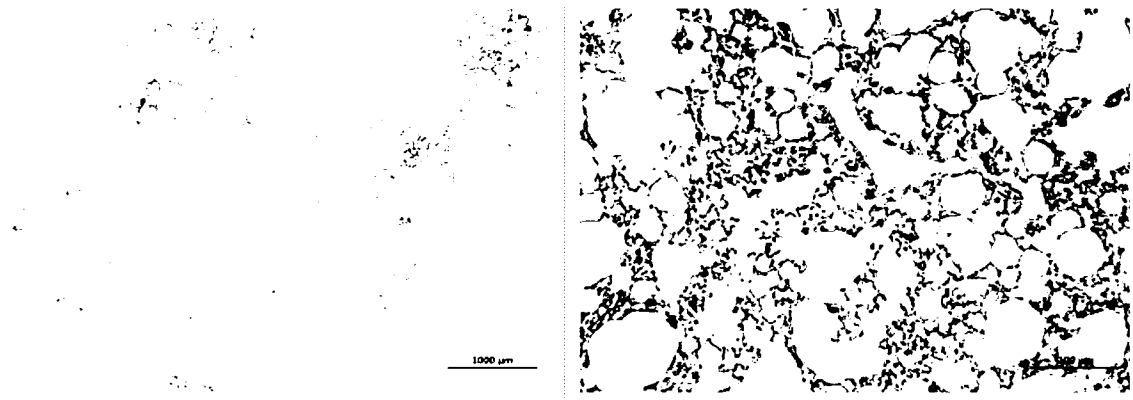


4W HE 染色肺泡炎症评分



8W HE 染色肺泡炎症评分

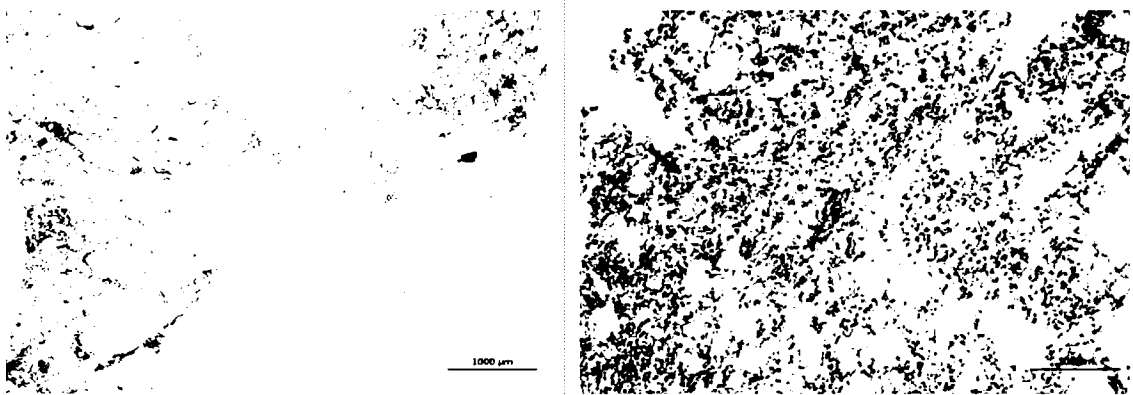
图3



0.11 4W-BIBF 7F masson 20

200

且组织中未见明显的胶原纤维增生。



0.11 4W-HRZ 肺 5F masson 20

200

且组织中可见多处轻度的胶原纤维增生（黑色箭头）。

图4

• 8W特殊染色阳性占比

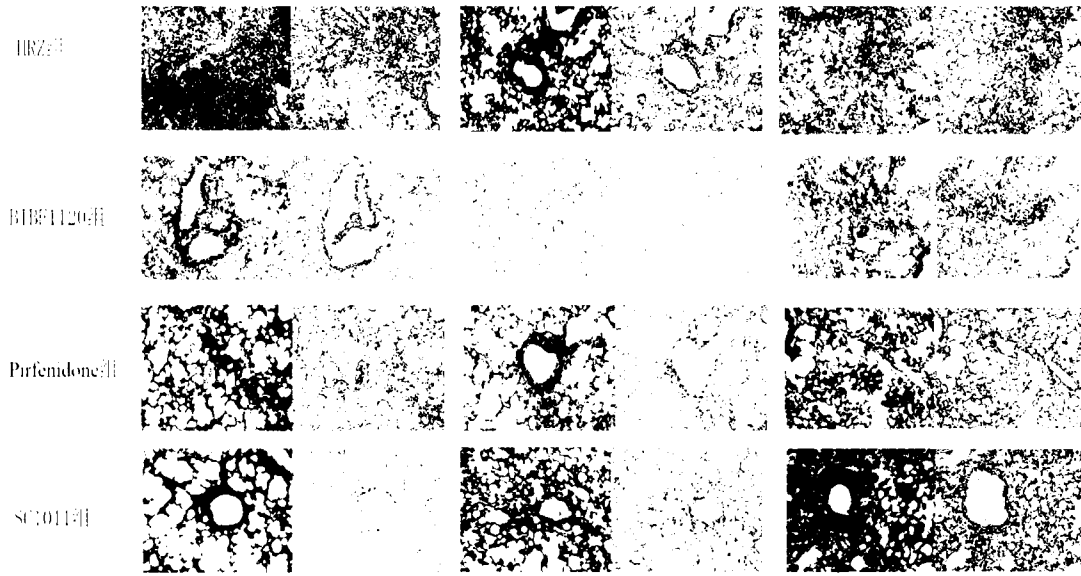


图5

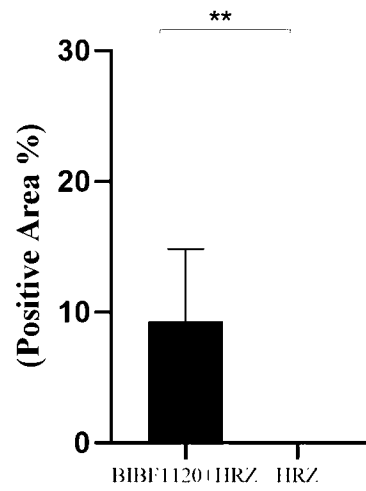


图6



BIBF1120



HRZ

图7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/081772

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K31/496(2006.01)i; A61K45/06(2006.01)i; A61K31/4409(2006.01)i; A61K31/4965(2006.01)i; A61P31/06(2006.01)i; A61P11/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNTXT, CNABS, DWPI, ENTXT, ENTXTC, WPABSC, WOTXT, USTXT, CJFD, CNKI, STN <sub>ext</sub> , 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, Web of Science: 首都医科大学附属北京胸科医院, 结核病胸部肿瘤研究所, 陆宇, 陈效友, 祁雪婷, 郑璐瑶, 付雷, 张炜焱, 王宁, 结核, 结核杆菌, 尼达尼布, 异烟肼, 利福平, 利福霉素, 吡嗪酰胺, 吡嗪, 酰胺, 异福酰胺, 乙胺丁醇, 喹诺酮, 链霉素, 卡那霉素, 阿米卡星, 卷曲霉素, 对氨基水杨酸, 异烟胺, 环丝氨酸, 氯法齐明, 利奈唑胺, nintedanib, BIBF, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, tuberculosis, MTB, ethambutol, quinolone, streptomycin, kanamycin, amikacin, capreomycin, aminosalicylic, isonicotinamide, cycloserine, clofazimine, linezolid, 656247-18-6, 656247-17-5, 13292-46-1, 54-85-3, 98-96-4		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114732818 A (BEIJING CHEST HOSPITAL, CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY et al.) 12 July 2022 (2022-07-12) claims 1-10	1-10
X	CN 105902507 A (FOSHAN TENGRUI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 August 2016 (2016-08-31) description, paragraphs 7 and 8	1-10
X	BATTAH, Basem et al. "A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles" <i>Molecules</i> , Vol. 24, 29 November 2019 (2019-11-29), document number 4373, pp. 1-12	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 July 2023		24 July 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/081772

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107019697 A (RUIYANG (SUZHOU) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 08 August 2017 (2017-08-08) description, paragraphs 12, 15, and 46-49	1-10
A	WO 2017118584 A1 (NERRE THERAPEUTICS LTD.) 13 July 2017 (2017-07-13) description, p. 11, line 12, p. 23, lines 13-16	1-10
A	CN 1857725 A (JINAN SHUAIHUA PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO, LTD.) 08 November 2006 (2006-11-08) claims 3 and 4	1-10
A	王洁 (WANG, Jie). "结核病的治疗及药物进展 (Non-official translation: Tuberculosis Treatment and Drug Progress)" <i>药学与临床研究 (Pharmaceutical and Clinical Research)</i> , Vol. 18, No. 5, 31 October 2010 (2010-10-31), pp. 415-419	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/081772**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114732818	A	12 July 2022	CN	114732818	B	10 February 2023
CN	105902507	A	31 August 2016	None			
CN	107019697	A	08 August 2017	None			
WO	2017118584	A1	13 July 2017	US	2017196860	A1	13 July 2017
				US	9750739	B2	05 September 2017
				BR	112018013903	A2	18 December 2018
				AU	2016384267	A1	05 July 2018
				AU	2016384267	B2	03 February 2022
				KR	20180100651	A	11 September 2018
				KR	102136017	B1	20 July 2020
				DK	3377064	T3	23 September 2019
				PL	3377064	T3	28 February 2020
				PT	3377064	T	23 July 2019
				LT	3377064	T	10 September 2019
				HRP	20191725	T1	27 December 2019
				JP	2019501162	A	17 January 2019
				JP	6621534	B2	18 December 2019
				US	2017326140	A1	16 November 2017
				HUE	045764	T2	28 January 2020
				RU	2018122121	A	11 February 2020
				RU	2018122121	A3	26 June 2020
				RU	2746601	C2	16 April 2021
				SI	3377064	T1	29 November 2019
				MX	2018008439	A	14 August 2018
				MX	371178	B	21 January 2020
				ES	2738678	T3	24 January 2020
				CA	3009283	A1	13 July 2017
				EP	3377064	A1	26 September 2018
				EP	3377064	B1	26 June 2019
				RS	59313	B1	31 October 2019
CN	1857725	A	08 November 2006	None			

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K31/496(2006.01)i; A61K45/06(2006.01)i; A61K31/4409(2006.01)i; A61K31/4965(2006.01)i; A61P31/06(2006.01)i; A61P11/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: A61K A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXT, CNABS, DWPI, ENTXT, ENTXTC, WPABSC, WOTXT, USTXT, CJFD, CNKI, STNext, 百度, 百度学术, Web of Science; 首都医科大学附属北京胸科医院, 结核病胸部肿瘤研究所, 陆宇, 陈效友, 祁雪婷, 郑璐瑶, 付雷, 张炜焱, 王宁, 结核, 结核杆菌, 尼达尼布, 异烟肼, 利福平, 利福霉素, 吡嗪酰胺, 吡嗪, 酰胺, 异福酰胺, 乙胺丁醇, 喹诺酮, 链霉素, 卡那霉素, 阿米卡星, 卷曲霉素, 对氨基水杨酸, 异烟胺, 环丝氨酸, 氯法齐明, 利奈唑胺, nintedanib, BIBF, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, tuberculosis, MTB, ethambutol, quinolone, streptomycin, kanamycin, amikacin, capreomycin, aminosalicylic, isonicotinamide, cycloserine, clofazimine, linezolid, 656247-18-6, 656247-17-5, 13292-46-1, 54-85-3, 98-96-4</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 114732818 A (首都医科大学附属北京胸科医院等) 2022年7月12日 (2022 - 07 - 12) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105902507 A (佛山市腾瑞医药科技有限公司) 2016年8月31日 (2016 - 08 - 31) 说明书第7-8段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>BATTAH, Basem等. "A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles" 《Molecules》, 第24卷, 2019年11月29日 (2019 - 11 - 29), 文献编号4373第1-12页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107019697 A (瑞阳(苏州)生物科技有限公司) 2017年8月8日 (2017 - 08 - 08) 说明书第12、15、46-49段</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 114732818 A (首都医科大学附属北京胸科医院等) 2022年7月12日 (2022 - 07 - 12) 权利要求1-10	1-10	X	CN 105902507 A (佛山市腾瑞医药科技有限公司) 2016年8月31日 (2016 - 08 - 31) 说明书第7-8段	1-10	X	BATTAH, Basem等. "A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles" 《Molecules》, 第24卷, 2019年11月29日 (2019 - 11 - 29), 文献编号4373第1-12页	1-10	A	CN 107019697 A (瑞阳(苏州)生物科技有限公司) 2017年8月8日 (2017 - 08 - 08) 说明书第12、15、46-49段	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 114732818 A (首都医科大学附属北京胸科医院等) 2022年7月12日 (2022 - 07 - 12) 权利要求1-10	1-10															
X	CN 105902507 A (佛山市腾瑞医药科技有限公司) 2016年8月31日 (2016 - 08 - 31) 说明书第7-8段	1-10															
X	BATTAH, Basem等. "A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles" 《Molecules》, 第24卷, 2019年11月29日 (2019 - 11 - 29), 文献编号4373第1-12页	1-10															
A	CN 107019697 A (瑞阳(苏州)生物科技有限公司) 2017年8月8日 (2017 - 08 - 08) 说明书第12、15、46-49段	1-10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年7月19日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年7月24日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>杨琳琳</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961852</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2017118584 A1 (NERRE THERAPEUTICS LIMITED) 2017年7月13日 (2017 - 07 - 13) 说明书第11页第12行, 第23页第13-16行	1-10
A	CN 1857725 A (济南帅华医药科技有限公司) 2006年11月8日 (2006 - 11 - 08) 权利要求3-4	1-10
A	王洁. "结核病的治疗及药物进展" 《药学与临床研究》, 第18卷, 第5期, 2010年10月31日 (2010 - 10 - 31), 第415-419页	1-10

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/081772

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	114732818	A	2022年7月12日	CN 114732818 B	2023年2月10日
CN	105902507	A	2016年8月31日	无	
CN	107019697	A	2017年8月8日	无	
WO	2017118584	A1	2017年7月13日	US 2017196860 A1	2017年7月13日
				US 9750739 B2	2017年9月5日
				BR 112018013903 A2	2018年12月18日
				AU 2016384267 A1	2018年7月5日
				AU 2016384267 B2	2022年2月3日
				KR 20180100651 A	2018年9月11日
				KR 102136017 B1	2020年7月20日
				DK 3377064 T3	2019年9月23日
				PL 3377064 T3	2020年2月28日
				PT 3377064 T	2019年7月23日
				LT 3377064 T	2019年9月10日
				HRP 20191725 T1	2019年12月27日
				JP 2019501162 A	2019年1月17日
				JP 6621534 B2	2019年12月18日
				US 2017326140 A1	2017年11月16日
				HUE 045764 T2	2020年1月28日
				RU 2018122121 A	2020年2月11日
				RU 2018122121 A3	2020年6月26日
				RU 2746601 C2	2021年4月16日
				SI 3377064 T1	2019年11月29日
				MX 2018008439 A	2018年8月14日
				MX 371178 B	2020年1月21日
				ES 2738678 T3	2020年1月24日
				CA 3009283 A1	2017年7月13日
				EP 3377064 A1	2018年9月26日
				EP 3377064 B1	2019年6月26日
				RS 59313 B1	2019年10月31日
CN	1857725	A	2006年11月8日	无	