

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991733 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.01.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/216* (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 17305094.9; 17305268.9; 17190723.1

(32) 2017.01.27; 2017.03.13; 2017.09.12

(33) EP

(86) PCT/EP2018/052159

(87) WO 2018/138352 2018.08.02

(71) Заявитель:
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:
Фукар Коринн, Вальчак Роберт,
Беланже Кароль, Ноэль Бенуа (FR)

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

(57) Настоящее изобретение относится к комбинированному продукту и его применению в терапии.

A1

201991733

201991733

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-557291EA/042

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Описание

Настоящее изобретение относится к комбинациям нитазоксанида (NTZ) или его производного в комбинации с агонистом PPAR для терапии.

[2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанوات (или нитазоксанид, или NTZ), впервые описанный в 1975 (Rossignol и Cavier, 1975), показал высокую степень эффективности против анаэробных простейших, гельминтов и широкого спектра микробов, включая как анаэробные, так и аэробные бактерии (Rossignol и Maisonneuve, 1984; Dubreuil, Houcke с соавт., 1996; Megraud, Occhialini с соавт., 1998; Fox и Saravolatz, 2005; Pankuch и Appelbaum, 2006; Finegold, Molitoris с соавт., 2009). Впервые он был изучен на людях для лечения кишечных цестод (Rossignol и Maisonneuve, 1984), и в настоящее время он разрешен к применению в Соединенных Штатах (Alinia®, Romark laboratories) для лечения диареи, вызванной простейшими паразитами *Cryptosporidium parvum* и *Giardia intestinalis*. NTZ также получил широкое коммерческое распространение в Латинской Америке и в Индии, где он показан для лечения широкого спектра кишечных паразитарных инфекций (Nemphill, Mueller с соавт., 2006). Предполагаемый механизм действия, с помощью которого NTZ проявляет свою противопаразитарную активность, заключается в ингибировании зависимых от фермента пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (PFOR) реакций переноса электронов, которые являются существенными для анаэробного метаболизма (Hoffman, Sisson с соавт., 2007). NTZ также проявлял активность против *Mycobacterium tuberculosis*, который не обладает гомологом PFOR, что предполагает альтернативный механизм действия. Действительно, авторы показали, что NTZ также может действовать как разобщающий агент, разрушающий мембранный потенциал и гомеостаз pH внутри организма (de Carvalho, Darby с соавт., 2011).

Фармакологические эффекты NTZ не ограничиваются его

противопаразитарной или антибактериальной активностью, и в последние годы в нескольких исследованиях было выявлено, что NTZ также может обеспечивать противовирусную активность (Di Santo и Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). NTZ препятствует репликации вируса различными способами, включая блокаду в процессе созревания белков гемагглютинаина (гриппа) или VP7 (ротавируса) или активации белка PKR, участвующего во врожденном иммунном ответе (для обзора см. (Rossignol, 2014)). Также было показано, что NTZ обладает широкими противоопухолевыми свойствами, вмешиваясь в важнейшие метаболические и способствующие смерти сигнальные пути (Di Santo и Ehrisman, 2014).

PPAR (α , β/δ (далее δ) и γ) принадлежат к семейству активируемых гормонами ядерных рецепторов. PPAR или "рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом", являются ядерными рецепторами суперсемейства факторов транскрипции, активируемых следующими лигандами: стероиды/гормоны щитовидной железы/ретиноиды. На сегодняшний день у мышей и у людей идентифицированы три изотипа PPAR: PPAR α , PPAR δ и PPAR γ . В то время как экспрессия PPAR β/γ у людей, по-видимому, является убиквитарной, PPAR α и γ демонстрируют дифференциальное распределение в тканях (Braissant O и Wahli W, 1998). PPAR α экспрессируется в клетках с высокой катаболической активностью жирных кислот и в клетках с высокой пероксисомальной активностью (гепатоциты, кардиомиоциты, почечные проксимальные каналцы, слизистая оболочка кишечника). PPAR β/δ экспрессируется повсеместно и в большом количестве в большинстве тканей. Что касается экспрессии PPAR γ , то она ограничена в основном жировой тканью, определенными клетками иммунной системы и сетчаткой и присутствует только в следовых количествах в других органах (Braissant O и Wahli W, 1998).

Возьмем в качестве примера PPAR α , его действие опосредуется классом соединений, таких как фибраты, которые оказывают липидоснижающее действие. Также были идентифицированы природные лиганды, такие как, например, жирные кислоты, эйкозаноиды (лейкотриен B₄) и 8(S)-гидроксиэйкозатетраеновая кислота

(Kliwer SA с соавт., 1997). PPAR связывали главным образом с метаболизмом липидов и глюкозы. Активаторы PPAR, такие как фибраты, позволяют регулировать концентрации холестерина и триглицеридов в плазме посредством активации PPAR α (Hourton D с соавт., 2001). Фибратная терапия приводит к увеличению окисления жирных кислот в печени. Фибраты также снижают синтез триглицеридов (Staels B и Auwerx J, 1998). Активаторы PPAR α также способны корректировать гипергликемию и уровень инсулина. Фибраты также уменьшают массу жировой ткани посредством механизма, который не зависит от приема пищи и экспрессии гена лептина (Guerre-Millo M с соавт., 2000). Терапевтическую пользу агонистов PPAR γ широко исследовали в лечении диабета 2 типа (Spiegelman BM, 1998). Было показано, что агонисты PPAR γ восстанавливают чувствительность к инсулину в тканях-мишенях и снижают уровни глюкозы, липидов и инсулина в плазме как на животных моделях диабета 2 типа, так и у людей (Ram VJ, 2003). Активация PPAR лигандами также играет роль в регуляции экспрессии генов, которые участвуют в таких процессах, как воспаление, ангиогенез, пролиферация и дифференцировка клеток, апоптоз и активность индуцибельной NO-синтетазы (iNOS), матриксной металлопротеиназы (MMPase) и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP). Активация PPAR α в кератиноцитах приводит к прекращению их пролиферации и экспрессии генов, участвующих в дифференцировке (Komuves LG с соавт., 2000). PPAR обладают противовоспалительными свойствами, поскольку они негативно влияют на механизмы транскрипции, вовлекающие другие факторы транскрипции, такие как NF- κ B, или активаторы транскрипции, такие как STAT и AP-1 (Desvergne B и Wahli W, 1999). Указанные противовоспалительные и антипролиферативные свойства делают PPAR (и особенно PPAR α) интересными терапевтическими мишенями для лечения таких заболеваний, как окклюзионные сосудистые заболевания (атеросклероз и т.д.), гипертония, заболевания, связанные с неоваскуляризацией (диабетическая ретинопатия и т.д.), воспалительные заболевания (воспалительные заболевания кишечника, псориаз и т.д.) и

неопластические заболевания (канцерогенез и т.д.)

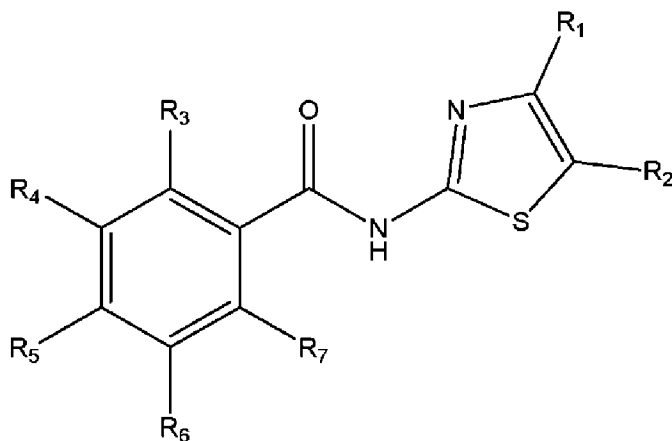
Настоящее изобретение описывает новые комбинации аналогов NTZ и агонистов PPAR и их применение в терапии, в частности, в лечении воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

Авторы изобретения обнаружили, что NTZ, синтетический антипротозойный агент, или его производные, или его метаболиты в комбинации с агонистами PPAR, проявляют терапевтические активности, которые полезны в терапии, в частности, для лечения иммунных, воспалительных, метаболических, фиброзных или холестатических заболеваний.

Следовательно, настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему:

- (i) соединение, выбранное из NTZ и его аналога; и
- (ii) по меньшей мере, один агонист PPAR.

В конкретном варианте осуществления соединение компонента (i) комбинированного продукта представляет собой соединение формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, в которых:

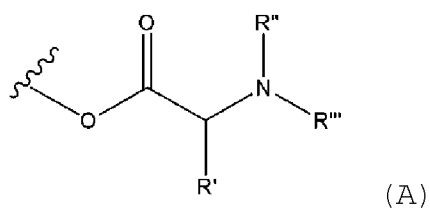
R₁ представляет собой атом водорода (H), атом дейтерия (D), атом галогена, (C₆-C₁₄)арильную группу, гетероциклическую группу, (C₃-C₁₄)циклоалкильную группу, (C₁-C₆)алкильную группу, сульфонильную группу, сульфоксидную группу, (C₁-C₆)алкилкарбонильную группу, (C₁-C₆)алкилокси, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, нитрогруппу (NO₂), аминогруппу (NH₂), (C₁-C₆)алкиламиногруппу, амидогруппу, (C₁-C₆)алкиламидогруппу, (C₁-C₆)диалкиламидогруппу.

R2 представляет собой атом водорода, атом дейтерия, группу NO₂, (C6-C14)арильную группу, гетероциклическую группу, атом галогена, (C1-C6)алкильную группу, (C3-C14)циклоалкильную группу, (C2-C6)алкинильную группу, (C1-C6)алкилоксигруппу, (C1-C6)алкилтиогруппу, (C1-C6)алкилкарбонильную группу, (C1-C6)алкилкарбониламиногруппу, (C6-C14)арилкарбониламиногруппу, карбоксильную или карбоксилатную группу, амидогруппу, (C1-C6)алкиламидогруппу, (C1-C6)диалкиламидогруппу, группу NH₂, (C1-C6)алкиламиногруппу,

или R1 и R2 вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную 5-8-членную циклоалкильную, гетероциклическую или арильную группу,

R3, R4, R5, R6 и R7, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода, атом дейтерия, атом галогена, гидроксильную группу, (C1-C6)алкилкарбонильную группу, (C1-C6)алкильную группу, (C1-C6)алкилоксигруппу, (C1-C6)алкилтиогруппу, (C1-C6)алкилкарбонилксигруппу, (C6-C14)арилоксигруппу, (C6-C14)арильную группу, гетероциклическую группу, (C3-C14)циклоалкильную группу, группу NO₂, сульфоаминоалкильную группу, группу NH₂, амино(C1-C6)алкильную группу, (C1-C6)алкилкарбониламиногруппу, карбоксильную группу, карбоксилатную группу или группу R9;

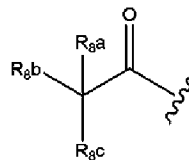
R9 представляет собой группу O-R8 или аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



где R' представляет собой (C1-C6)алкильную группу, (C2-C6)алкенильную группу, (C2-C6)алкинильную группу, (C3-C14)циклоалкильную группу, (C3-C14)циклоалкилалкильную группу,

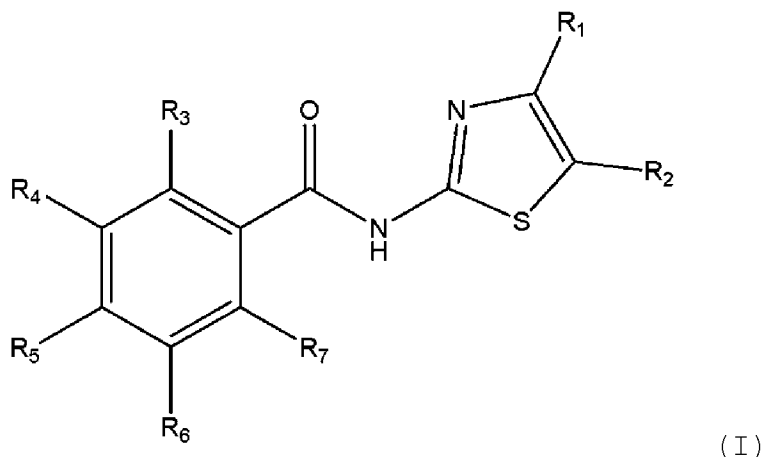
(С3-С14) циклоалкил (С2-С6) алкенильную группу, (С3-С14) циклоалкенильную группу, (С3-С14) циклоалкенил (С1-С6) алкильную группу, (С3-С14) циклоалкенил (С2-С6) алкенильную группу, (С3-С14) циклоалкенил (С2-С6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (С1-С6) алкильную группу или защитную группу азота.

R8 представляет собой атом водорода, атом дейтерия,



глюкуронидильную группу или группу, в которой R_{8a}, R_{8b} и R_{8c}, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода или атом дейтерия.

В дополнительном конкретном варианте осуществления соединения компонента (i) комбинированного продукта представляет собой соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемую соль, в которых:

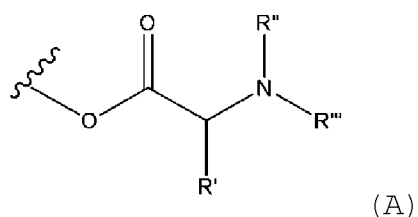
R₁ представляет собой атом водорода (H), атом дейтерия (D), атом галогена, (С6-С14) арильную группу, гетероциклическую группу, (С3-С14) циклоалкильную группу, (С1-С6) алкильную группу, сульфонильную группу, сульфоксидную группу, (С1-С6) алкилкарбонильную группу, (С1-С6) алкилокси, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, группу NO₂, группу NH₂, (С1-С6) алкиламиногруппу, амидогруппу, (С1-С6) алкиламидогруппу, (С1-С6) диалкиламидогруппу.

R₂ представляет собой атом водорода, атом дейтерия, группу NO₂, (С6-С14) арильную группу, гетероциклическую группу, атом

галогена, (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C1-C6) алкилоксигруппу, (C1-C6) алкилтиогруппу, (C1-C6) алкилкарбонильную группу, (C1-C6) алкилкарбониламиногруппу, (C6-C14) арилкарбониламиногруппу, карбоксильную или карбоксилатную группу, амидогруппу, (C1-C6) алкиламидогруппу, (C1-C6) диалкиламидогруппу, группу NH₂, (C1-C6) алкиламиногруппу,

или R₁ и R₂ вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную 5-8-членную циклоалкильную, гетероциклическую или арильную группу,

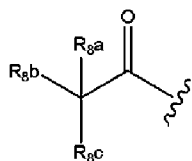
R₃ представляет собой атом водорода, атом дейтерия, атом галогена, группу O-R₈, (C1-C6) алкилкарбонильную группу, (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилоксигруппу, (C1-C6) алкилтиогруппу, (C1-C6) алкилкарбонилксигруппу, (C6-C14) арилоксигруппу, (C6-C14) арильную группу, гетероциклическую группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, NO₂, сульфоаминоалкильную группу, группу NH₂, amino (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилкарбониламиногруппу, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкилалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и

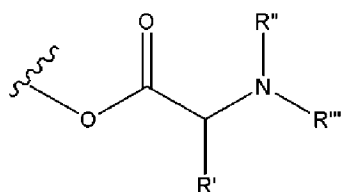
R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или защитную группу азота.

R8 представляет собой атом водорода, атом дейтерия или



группу, в которой R8a, R8b и R8c, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода или атом дейтерия.

R4, R5, R6 и R7, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода, атом дейтерия, атом галогена, гидроксильную группу, (C1-C6) алкилкарбонильную группу, (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилоксигруппу, (C1-C6) алкилтиогруппу, (C1-C6) алкилкарбонилксигруппу, (C6-C14) арилоксигруппу, (C6-C14) арильную группу, гетероциклическую группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, NO2, сульфониламино (C1-C6) алкильную группу, группу NH2, амино (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилкарбониламиногруппу, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



(A)

где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или

защитную группу азота;

или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления в соединении формулы (I) по настоящему изобретению:

(C1-C6)алкильная группа может представлять собой замещенную или незамещенную (C1-C6)алкильную группу, в частности замещенную или незамещенную (C1-C4)алкильную группу;

(C2-C6)алкинильная группа может представлять собой замещенную или незамещенную (C2-C6)алкинильную группу;

(C3-C14)циклоалкильная группа может представлять собой замещенную или незамещенную (C3-C14)циклоалкильную группу

(C1-C6)алкилоксигруппа может быть замещенной или незамещенной, такой как замещенная или незамещенная (C1-C4)алкилоксигруппа;

(C1-C6)алкилтиогруппа может быть либо замещенной, либо незамещенной, такой как замещенная или незамещенная (C1-C4)алкилтиогруппа;

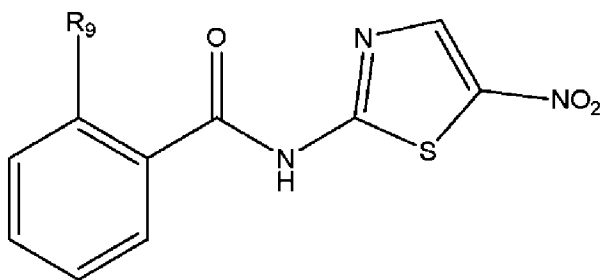
(C1-C6)алкиламиногруппа может представлять собой (C1-C4)алкиламиногруппу;

(C1-C6)диалкиламиногруппа может представлять собой (C1-C4)диалкиламиногруппу;

(C6-C14)арильная группа может представлять собой замещенную или незамещенную (C6-C14)арильную группу;

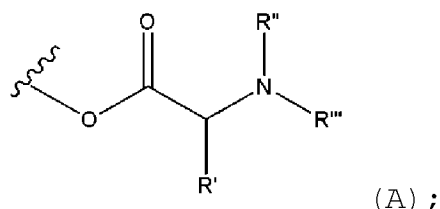
гетероциклическая группа может представлять собой замещенную или незамещенную гетероциклоалкильную или гетероарильную группу.

В конкретном варианте осуществления соединение компонента (i) комбинированного продукта представляет собой соединение формулы (II)



(II)

в котором R9 представляет собой атом водорода, атом дейтерия, группу O-R8 (R8 определен выше) или аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):

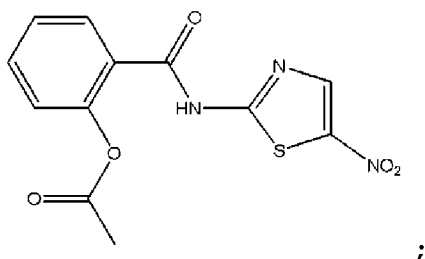


где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или защитную группу азота

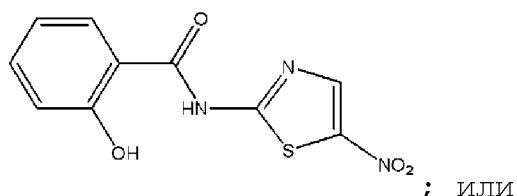
или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) комбинированного продукта по изобретению выбран из:

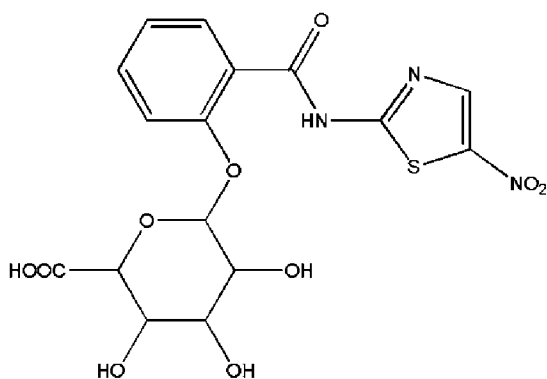
- NTZ:



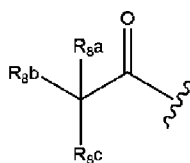
- тизоксанида:



- тизоксанида глюкуронида (TZG):



В другом варианте осуществления компонент (i) комбинированного продукта представляет собой соединение формулы (I) или (II), где R8 представляет собой атом водорода, атом

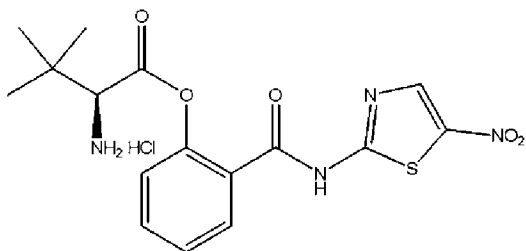


дейтерия или группу, в которой R8a, R8b и R8c, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода или атом дейтерия; и/или

где R1, R3, R4, R5 и R6, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода или атом дейтерия при условии, что R1, R2, R2a, R2b, R2c, R3, R4, R5 и R6 не представляют собой одновременно атом водорода.

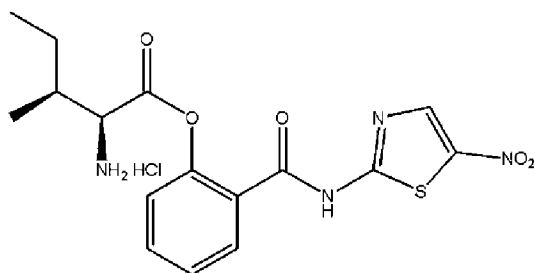
В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой [(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d3) этаноат, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d2) этаноат; или 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d1) этаноат.

В другом конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой ((S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноат гидрохлорид) (RM5061) формулы:



В другом конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой ((2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил

2-амино-3-метилпентаноат гидрохлорид) (RM5066) формулы:



В дополнительном конкретном варианте осуществления агонист PPAR представляет собой агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-гамма, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа/гамма, двойной агонист PPAR-альфа/дельта, двойной агонист PPAR-гамма/дельта или пан-агонист PPAR-альфа/гамма/дельта.

Согласно изобретению агонист(ы) PPAR и компонент (i), входящие в комбинацию изобретения, могут быть выбраны так, чтобы комбинация указанного агониста(ов) PPAR и компонента (i) комбинации по изобретению обеспечивала синергетическое действие против воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний. Такая синергия может быть определена в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, такими как использование метода приращения по Блисссу (EOB), описанного в примерах.

В конкретном варианте осуществления компонент (ii) комбинированного продукта представляет собой:

- по меньшей мере один агонист PPAR-альфа;
- по меньшей мере один агонист PPAR-гамма;
- по меньшей мере один агонист PPAR-дельта;
- по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа/дельта;
- по меньшей мере один агонист PPAR-альфа и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта;
- по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа/гамма;
- по меньшей мере один агонист PPAR-альфа и по меньшей мере один агонист PPAR-гамма;
- по меньшей мере один двойной агонист PPAR-гамма/дельта;
- по меньшей мере один агонист PPAR-гамма и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта;
- по меньшей мере один пан-агонист PPAR-альфа/гамма/дельта; и

по меньшей мере один агонист PPAR-альфа, по меньшей мере один агонист PPAR-гамма и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта.

Согласно настоящему изобретению термин "агонисты PPAR" относится к агонистам рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом, которые представляют собой класс лекарственных средств, играющих центральную роль в гомеостазе липидов и глюкозы. PPAR α главным образом влияет на метаболизм жирных кислот, и его активация снижает уровень липидов, тогда как PPAR γ главным образом принимает участие в регуляции адипогенеза, энергетического баланса и биосинтеза липидов. PPAR δ участвует в окислении жирных кислот, главным образом в скелетных и сердечных мышцах, но также регулирует уровень глюкозы и холестерина в крови.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа" в контексте настоящего документа, включает, но не ограничивается ими, фенофибрат, ципрофибрат, пемафибрат, гемфиброзил, клофибрат, бинифибрат, клинофибрат, клофибриновую кислоту, никофибрат, пирифибрат, плафибрид, ронифибрат, теофибрат, токофибрат и SR10171.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-гамма" в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, Росиглитазон, Пиоглитазон, дейтерированный пиоглитазон, Эфатутазон, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001 и ALL-4.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-дельта" в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, GW501516 (Эндурабол или $\{4-[(4\text{-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3\text{-тиазол-5-ил}]\text{метил}]\text{сульфанил}]-2\text{-метилфенокси}\}\text{уксусная кислота}\}$), MBX8025 (Селадельпар или $\{2\text{-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметил-фенил)-2H-[1,2,3]\text{триазол-4-илметилсульфанил}]\text{фенокси}\}\text{уксусную кислоту}\}$), GW0742 ($\{4-[[2-[3\text{-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5\text{-тиазолил}]\text{метил}]\text{тио}]-2\text{-метилфенокси}\}\text{уксусную кислоту}\}$), L165041, HPP-593 и NCP-1046.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-

альфа/гамма" (также называемый глитазары) в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, Сароглитазар, Алеглитазар, Мураглитазар, Тезаглитазар и DSP-8658.

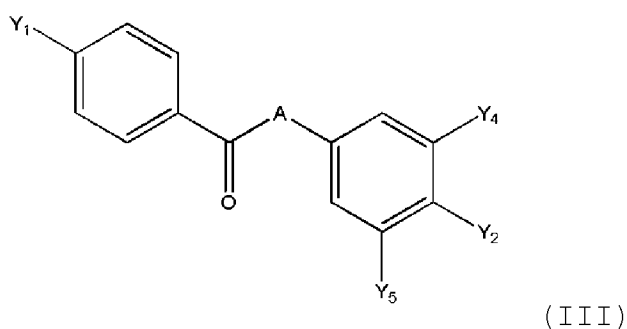
В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа/дельта" в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, Элафибранор (GFT505) или T913659.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-гамма/дельта" в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, конъюгированную линолевую кислоту (CLA), T3D-959.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа/гамма/дельта" в контексте настоящего документа включает, но не ограничивается ими, IVA337 (Ланифибранор), ТТА (тетрадецилтиоуксусную кислоту), Бавачинин, GW4148, GW9135, Безафибрат, Лобеглитазон и CS038. В дополнительном варианте осуществления агонист PPAR-альфа/гамма/дельта представляет собой 2-(4-(5,6-метилендиоксибензо[d]тиазол-2-ил)-2-метилфенокси)-2-метилпропановую кислоту (MHY2013).

Агонист PPAR может быть в форме соли, гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла. Агонист PPAR также может быть в форме гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла соли.

В более конкретном варианте осуществления агонист PPAR представляет собой соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль:



в которых:

Y1 представляет собой галоген, группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу CH=CH или CH₂-CH₂;

Y2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga и Gb, одинаковые или разные, представляют собой атом

кислорода или серы;

Ra представляет собой атом водорода, незамещенную (C1-C6) алкильную группу, (C6-C14) арильную группу или (C1-C6) алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, (C1-C6) алкокси или (C1-C6) алкилтиогруппу, (C3-C14) циклоалкильные группы, (C3-C14) циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

Rb представляет собой (C1-C6) алкильную группу, замещенную по меньшей мере группой -COORc, где Rc представляет собой атом водорода или (C1-C6) алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C3-C14) циклоалкильные группы или гетероциклические группы; и

Y4 и Y5, одинаковые или разные, представляют собой (C1-C6) алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C3-C14) циклоалкильные группы или гетероциклические группы.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (III):

Y1 представляет собой галоген, группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу CH=CH;

Y2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga и Gb, одинаковые или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

Ra представляет собой (C1-C6) алкильную или (C3-C14) циклоалкильную группу, в частности (C1-C7) алкильную или (C3-C14) циклоалкильную группу, замещенную или не замещенную одним или несколькими атомами галогена;

Rb представляет собой (C1-C6) алкильную группу, замещенную группой -COOR3, где Rc представляет собой атом водорода или алкильную группу, имеющую от одного до четырех атомов углерода; и

Y4 и Y5 независимо представляют собой (C1-C4) алкильную группу.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (III):

Y1 представляет группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу $\text{CH}_2\text{-CH}_2$;

Y2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga представляет собой атом кислорода или серы, а Gb представляет собой атом кислорода;

Ra представляет собой (C1-C6) алкильную или (C3-C7) циклоалкильную группу;

Rb представляет собой (C1-C6) алкильную группу, замещенную, по меньшей мере группой $-\text{COORc}$, где Rc представляет собой атом водорода или (C1-C4) алкильную группу; и

Y4 и Y5 независимо представляют собой (C1-C4) алкильную группу.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (III):

Y1 представляет собой атом галогена или группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу $\text{CH}_2\text{-CH}_2$;

Y2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga представляет собой атом кислорода или серы, а Gb представляет собой атом кислорода;

Ra представляет собой (C1-C6) алкильную или (C3-C14) циклоалкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена;

Rb представляет собой (C1-C6) алкильную группу, замещенную или не замещенную одним или несколькими атомами галогена и замещенную по меньшей мере группой $-\text{COORc}$, где Rc представляет собой атом водорода или (C1-C4) алкильную группу; и

Y4 и Y5 представляют собой (C1-C4) алкильную группу.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (III) Gb представляет собой атом кислорода, а Rb представляет собой (C1-C6) алкильную группу, замещенную группой $-\text{COORc}$, где Rc представляет собой атом водорода или незамещенную линейную или разветвленную (C1-C4) алкильную группу.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (III) Y1 представляет собой (C1-C6) алкилтиогруппу, которая содержит (C1-C6) алкильную группу, которая является линейной или разветвленной, которая замещена или не замещена одним или

несколькими атомами галогена.

В конкретном варианте осуществления соединение формулы (III) выбрано из группы, состоящей из 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она (Элафибранор или GFT505), 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метилпропановой кислоты и изопропилового сложного эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метил-пропановой кислоты.

В более конкретном варианте осуществления агонист PPAR представляет собой 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-он (или Элафибранор - GFT505) или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления комбинированного продукта по изобретению:

- компонент (ii) выбран из группы, состоящей из Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара и Ланифибранора, причем компонент (ii) более конкретно представляет собой Элафибранор;

- компонент (i) выбран из NTZ, TZ, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1) этаноата, ((S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата гидрохлорида) или ((2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил-2-амино-3-

метилпентаноата гидрохлорида).

В дополнительном варианте осуществления компонент (i) выбран из TZG, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата (такого как (S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноат или его гидрохлоридная соль), 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата (такого как (2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноат или его гидрохлоридная соль), 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата (такого как (S)-2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноат или его гидрохлоридная соль) и 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата (такого как (2S,3S)-2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноат или его гидрохлоридная соль). В дополнительном варианте этого варианта осуществления компонент (ii) выбран из группы, состоящей из Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара и Ланифибранора, причем компонент (ii) более конкретно представляет собой Элафибранор; и компонент (i) выбран из TZG, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата (такого как (S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноат или его гидрохлоридная соль), 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата (такого как (2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноат или его гидрохлоридная соль), 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата (такого как (S)-2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноат или его гидрохлоридная соль) и 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата (такого как (2S,3S)-2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноат или его гидрохлоридная соль).

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один другой терапевтически активный агент, такой как антифиброзный агент, противовоспалительный агент или иммунодепрессант.

Иллюстративные антифиброзные агенты включают ингибиторы

пирфенидона или рецепторной тирозинкиназы (RTKI), такие как Нинтеданиб, Сорафениб и другие RTKI, или блокаторы рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитор CTGF, или любое антифибротическое соединение, чувствительное к препятствованию TGF β и BMP-активированных путей, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1, или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , Активин, ингибин, Нодаль, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие SMAD-белки, или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, Rho-подобные сигнальные пути GTPase, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/АКТ, TGF β -индуцированный процесс EMT, или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая Hh-лиганды или гены-мишени, или любые члены WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .

Иллюстративные противовоспалительные агенты и/или иммунодепрессанты включают глюкокортикоиды, НПВП, циклофосфамид, нитрозомочевины, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пурина, аналоги пиримидина, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин, мириоцин, такролимус, сиролимус, производные микофеноловой кислоты, Финголимод и другие модуляторы сфингозин-1-фосфатных рецепторов, моноклональные и/или поликлональные антитела против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и провоспалительные рецепторы цитокинов, Т-клеточный рецептор и интегрины.

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт по изобретению представляет собой композицию, содержащую компоненты (i) и (ii), как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт представляет собой набор частей, содержащих компоненты (i) и (ii), как описано выше, для последовательного, отдельного или

одновременного применения.

В дополнительном варианте осуществления компоненты i) и ii) объединяют в лекарственную форму в виде инъектируемой суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или средства галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

В другом варианте осуществления компоненты (i) и (ii) комбинированного продукта полезны в лечении любого из заболеваний, упомянутых выше.

Настоящее изобретение также относится к комбинированному продукту по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к комбинированному продукту, раскрытому в настоящем документе, для применения в способе лечения заболевания. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества комбинированного продукта, описанного в настоящем документе. В другом варианте осуществления предоставлено применение комбинированного продукта по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания.

В частности, комбинированный продукт по настоящему изобретению полезен для лечения заболеваний, таких как иммунные, воспалительные, метаболические, фиброзные и холестатические заболевания. В конкретном варианте осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), обусловленных действием лекарственного средства заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, индуцированных возбудителем инфекции заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, обусловленных нарушением функции иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный

холангит (РВС), билиарная атрезия, наследственный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, келоидных рубцов, перенесенного инфаркта миокарда, склеродермии/системного склероза, воспалительных заболеваний, нейродегенеративных заболеваний, раковых заболеваний, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака ЖКТ, рака желудка, менингиомы, вызванной нейрофиброматозом, нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы, экзокринных опухолей поджелудочной железы, лейкемии, миелопролиферативных/миелодиспластических заболеваний, мастоцитоза, дерматофибросаркомы, солидных опухолей, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или толстой и прямой кишки, рака предстательной железы, фиброза или цирроза печени любого происхождения, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, обусловленного действием лекарственного средства фиброза или цирроза печени, индуцированного возбудителем инфекции фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного вирусной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита В, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита С, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного двойной инфекцией вируса гепатита С и ВИЧ, фиброза или цирроза печени, вызванного лучевой терапией или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие какого-либо хронического холестатического заболевания, фиброза ЖКТ любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, тонкого кишечника), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза кожи, фиброза эпидермиса, фиброза эндодермы, фиброза кожи вследствие склеродермии/системного склероза, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических

воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF), фиброза сердца, фиброза почек, нефрогенного системного фиброза, фиброза мышц, фиброза мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброза костного мозга, фиброза суставов, фиброза сухожилий, фиброза хрящей, фиброза поджелудочной железы, фиброза матки, фиброза нервной системы, фиброза яичек, фиброза яичников, фиброза надпочечников, фиброза артерий, фиброза вен, фиброза глаз, эндомиокардиального фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, массивного прогрессирующего фиброза (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, периимплантационного фиброза и асбестоза, артрофиброза, адгезивного капсулита.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), обусловленных действием лекарственного средства заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, индуцированных возбудителем инфекции заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, обусловленных нарушением функции иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, наследственный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака ЖКТ, рака желудка, рака толстой и прямой кишки, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, обусловленного действием лекарственного средства фиброза или

цирроза печени, индуцированного возбудителем инфекции фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного вирусной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита В, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита С, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванный двойной инфекцией вируса гепатита С и ВИЧ, фиброза или цирроза печени, вызванного лучевой терапией или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие какого-либо хронического холестатического заболевания, фиброза ЖКТ любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, тонкого кишечника), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF).

В дополнительном аспекте изобретение относится к комбинации по изобретению для применения в ингибировании пролиферации и/или активации фибробластов, ответственных за выработку коллагеновых волокон и/или ответственных за выработку внеклеточного матрикса.

Согласно настоящему изобретению термин "аутоиммунные заболевания" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате аномального иммунного ответа организма на вещества и ткани, обычно присутствующие в организме. Заболевание может быть ограничено определенными органами (например, при диабете I типа или аутоиммунном тиреоидите) или поражать определенную ткань в разных местах (например, при болезни Гудпасчера, поражении базальной мембраны в легких и почках).

Термин "воспаление" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате защитного ответа с участием клеток-хозяина, кровеносных сосудов и белков, и других медиаторов, которые могут служить для устранения причины повреждения клеток/тканей, а также некротических клеток/тканей,

возникающих вследствие первоначального повреждения, и начала процесса заживления. Воспалительная реакция может проявляться болью, жаром, покраснением, отеком, расширением кровеносных сосудов, увеличением кровотока и потерей функции.

Термины "фиброз", "фиброзная болезнь", "фиброзное расстройство" и их склонения означают патологическое состояние чрезмерного отложения фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Более конкретно, фиброз представляет собой патологический процесс, который включает в себя непрерывное образование фиброзного рубца и перепроизводство внеклеточного матрикса соединительной тканью в ответ на повреждение ткани. Физиологически отложение соединительной ткани может нарушить архитектуру и функцию нижележащего органа или ткани.

Согласно настоящему изобретению фиброз или фиброзное расстройство могут относиться к фиброзу любого органа или ткани. Иллюстративные, не ограничивающие примеры конкретного фиброза органа включают фиброз печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичек, полового члена, яичников, надпочечников, артерий, вен, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов (например, коленного, плечевого или других суставов) или желудка.

В конкретном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичек, яичников, надпочечников, артерий, вен, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов (например, коленного, плечевого или других суставов), глаз или желудка.

В предпочтительном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, ЖКТ, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей (например,

средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, кишечника и суставов (например, коленного, плечевого или других суставов).

В более предпочтительном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легких, кишечника, сердца, кожи, почек и кишечника.

В другом варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легких, сердца и кишечника. В более конкретном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легких, кожи, почек и кишечника. В другом варианте осуществления фиброзное расстройство представляет собой фиброз печени.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подвергаемое лечению фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из следующего неисчерпывающего перечня фиброзных расстройств: неалкогольный стеатогепатит (NASH), легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз, фиброз кожи, фиброз глаз (такой как капсулярный фиброз), эндомиокардиальный фиброз, фиброз средостения, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессивный фиброз (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, фиброз легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей (ХОБЛ, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, IPF), алкоголь-индуцированный или обусловленный действием лекарственного средства фиброз печени, цирроз печени, вызванный инфекцией фиброз печени, фиброз, вызванный лучевой терапией или химиотерапией, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, язвенный колит, келоидный рубец, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермия/системный склероз, артрофиброз, некоторые формы адгезивного капсулита, хронические фиброзирующие холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC) и первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, наследственный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), периимплантационный фиброз и асбестоз.

Холестаз определяется как уменьшение потока желчи из-за нарушенной секреции гепатоцитами (гепатоцеллюлярный холестаз)

или обструкции потока желчи через внутри- или внепеченочные желчные протоки (обструктивный холестаз). В клинической практике холестаз представляет собой любое состояние, при котором отток желчи из печени замедляется или блокируется. В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутрипеченочного холестаза беременных, прогрессирующего наследственного внутрипеченочного холестаза, билиарной атрезии, желчнокаменной болезни, инфекционного холангита, холангита, вызванного гистиоцитозом из клеток Лангерганса, синдрома Алажиля, несиндромной недостаточности протоков, обусловленного действием лекарственного средства холестаза и холестаза, вызванного полным парентеральным питанием. В предпочтительном варианте осуществления холестатическое заболевание представляет собой PBC или PSC, в частности PBC.

Примеры воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний, метаболических заболеваний и холестатических заболеваний включают метаболические заболевания печени, неалкогольную жировую дистрофию печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), обусловленные действием лекарственного средства заболевания печени, алкоголь-индуцированные заболевания печени, индуцированные возбудителем инфекции заболевания печени, воспалительные заболевания печени, обусловленные нарушением функции иммунной системы заболевания печени, дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания, рестеноз, синдром X, метаболический синдром, диабет, ожирение, гипертензию, хронические холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, наследственный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, келоидный рубец, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермию/системный склероз, воспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания, раковые заболевания, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак ЖКТ, рак желудка, менингиому, вызванную нейрофиброматозом, нейроэндокринные

опухоли поджелудочной железы, экзокринные опухоли поджелудочной железы, лейкемию, миелопролиферативные/миелодиспластические заболевания, мастоцитоз, дерматофибросаркому, солидные опухоли, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или толстой и прямой кишки, рак предстательной железы, фиброз или цирроз печени любого происхождения, фиброз или цирроз печени, вызванный метаболическими заболеваниями, NAFLD-индуцированный фиброз или цирроз, NASH-индуцированный фиброз или цирроз, алкоголь-индуцированный фиброз или цирроз печени, обусловленный действием лекарственного средства фиброз или цирроз печени, индуцированный возбудителем инфекции фиброз или цирроз печени, фиброз или цирроз печени, вызванный паразитарной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный бактериальной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный вирусной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный инфекцией вируса гепатита В, фиброз или цирроз печени, вызванный инфекцией вируса гепатита С, фиброз или цирроз печени, вызванный ВИЧ-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный двойной инфекцией вируса гепатита С и ВИЧ, фиброз или цирроз печени, вызванный лучевой терапией или химиотерапией, фиброз желчных путей, фиброз или цирроз печени вследствие какого-либо хронического холестатического заболевания, фиброз ЖКТ любой этиологии, фиброз, вызванный болезнью Крона, фиброз, вызванный язвенным колитом, фиброз кишечника (например, тонкого кишечника), фиброз толстой кишки, фиброз желудка, фиброз кожи, фиброз эпидермиса, фиброз эндодермы, фиброз кожи вследствие склеродермии/системного склероза, фиброз легких, фиброз легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF), фиброз сердца, фиброз почек, нефрогенный системный фиброз, фиброз мышц, фиброз мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), фиброз костного мозга, фиброз суставов, фиброз сухожилий, фиброз хрящей, фиброз поджелудочной железы, фиброз матки, фиброз нервной системы, фиброз яичек, фиброз яичников, фиброз надпочечников, фиброз артерий, фиброз вен, фиброз глаз,

эндомиокардиальный фиброз, фиброз средостения, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессивный фиброз (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, периимплантационный фиброз и асбестоз, артрофиброз, адгезивный капсулит.

Предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), обусловленных действием лекарственного средства заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, индуцированных возбудителем инфекции заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, обусловленных нарушением функции иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, наследственный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака ЖКТ, рака желудка, рака толстой и прямой кишки, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, обусловленного действием лекарственного средства фиброза или цирроза печени, индуцированного возбудителем инфекции фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного вирусной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита В, фиброза или цирроза печени, вызванного инфекцией вируса гепатита С, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного двойной инфекцией вируса гепатита С и ВИЧ, фиброза или цирроза печени, вызванного лучевой терапией или

химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие какого-либо хронического холестатического заболевания, фиброза ЖКТ любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, тонкого кишечника), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF).

Термин "лечение" или "лечащий" относится к лечению или профилактике фиброзного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом. Лечение включает введение комбинации по изобретению субъекту, имеющему заявленное расстройство, то есть пациенту, чтобы предотвратить, вылечить, отсрочить, инвертировать или замедлить прогрессирование расстройства, улучшая тем самым состояние субъекта. Лечение также может быть назначено субъекту, который здоров или подвержен риску развития фиброзного расстройства.

Следовательно, согласно изобретению лечение иммунного, воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания включает введение комбинации по настоящему изобретению, например, в форме фармацевтической композиции, содержащей компоненты (i) и (ii) комбинации, субъекту, имеющему заявленное расстройство, чтобы вылечить, отсрочить, инвертировать или замедлить прогрессирование расстройства, таким образом улучшая состояние пациента, или здоровому субъекту, в частности субъекту, который подвержен риску развития такого заболевания.

Лечение включает введение комбинации по изобретению пациенту, имеющему заявленное расстройство, чтобы вылечить, отсрочить, инвертировать или замедлить прогрессирование, таким образом улучшая состояние пациента, или здоровому субъекту, в частности субъекту, который подвержен риску развития воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания.

Подлежащий лечению субъект представляет собой

млекопитающее, предпочтительно человека. Субъект, подлежащий лечению в соответствии с изобретением, может быть выбран на основе нескольких критериев, связанных с фиброзными заболеваниями, таких как предшествующее лечение лекарственными средствами, сопутствующие патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также на основании обнаружения любого релевантного биомаркера, который можно оценить с помощью методов визуализации и иммунологических, биохимических, ферментных, химических методов обнаружения или методов обнаружения нуклеиновых кислот.

Субъекты, подлежащие лечению в соответствии с изобретением, могут быть выбраны на основе нескольких критериев, связанных с воспалительными, метаболическими, фиброзными и холестатическими заболеваниями, таких как предшествующее лечение лекарственными средствами, сопутствующие патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также любой другой релевантный биомаркер, который можно оценить с помощью методов визуализации и иммунологического, биохимического, ферментного, химического метода обнаружения или метода обнаружения нуклеиновых кислот.

Синтез NTZ или аналогов может, например, осуществляться, как описано в (Rossignol и Cavier, 1975), или любым другим способом синтеза, известным специалисту в данной области техники.

В конкретном варианте осуществления лечение воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания может включать введение композиции, содержащей по меньшей мере два соединения, выбранных из аналогов NTZ и NTZ. В этом варианте осуществления вводимый по меньшей мере один агонист PPAR предоставляется в той же композиции, что и те два соединения, или в отдельной форме, например, в другой композиции.

В другом варианте осуществления комбинация по изобретению предназначена для одновременного, последовательного или раздельного введения в терапии, поэтому допустимо, чтобы она была включена в различные композиции. В случае последовательного

введения, NTZ и/или аналог(и) NTZ могут быть введены до агониста(ов) PPAR, или агонист(ы) PPAR вводят до аналога(ов) NTZ и/или NTZ.

NTZ и аналог(и) NTZ могут быть включены в лекарственную форму в виде фармацевтически приемлемых солей, в частности кислотных или основных солей, совместимых с фармацевтическим применением. Соли NTZ и аналог(и) NTZ включают фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты, фармацевтически приемлемые соли присоединения основания, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированного аммония. Эти соли могут быть получены во время конечной стадии очистки соединения или путем включения соли в предварительно очищенное соединение.

Комбинация соединения формулы (I) или (II) с одним или несколькими агонистом(ами) PPAR может быть составлена в виде фармацевтически приемлемых нетоксичных солей, полученных из органических или неорганических оснований или кислот соединения формулы (I) или (II) или агониста(ов) PPAR. Эти соли могут быть получены во время конечной стадии очистки соединения или путем включения соли в предварительно очищенное соединение.

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

Эти композиции могут также содержать один или несколько агентов или носителей, выбранных среди диспергаторов, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов и т.д. Агенты или носители, используемые для этих составов (жидкие и/или инъеклируемые и/или твердые), в частности, представляют собой метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полисорбат 80, маннит, желатин, лактозу, растительные масла, аравийскую камедь, липосомы и т.д.

Эти композиции могут быть составлены в форме инъектируемых суспензий, гелей, масел, мазей, пилюль, суппозиториях, порошков, гелевых капсул, капсул, аэрозолей и т.д., в ряде случаев с помощью галеновых форм или устройств, обеспечивающих пролонгированное и/или медленное высвобождение. Для этого типа состава могут быть преимущественно использованы такие агенты, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие соединение формулы (I) или (II) и один или несколько агонист(ов) PPAR, могут быть введены различными путями и в виде различных форм. Например, соединение(я) может(могут) быть введено(ы) через системный путь, перорально, парентерально, путем ингаляции, с помощью назального спрея, путем закапывания в нос или путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечным путем, подкожным путем, трансдермальным путем, путем местного применения, внутриартериальным путем и т.д.

Конечно, способ введения будет подобран к форме NTZ и/или аналога(ов) NTZ в комбинации с одним или несколькими агонистом(ами) PPAR в соответствии с процедурами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

NTZ и/или аналог(и) NTZ в комбинации с одним или несколькими агонистом(ами) PPAR вводят в терапевтически эффективном количестве. В контексте изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, достаточному для получения желаемого терапевтического результата.

Частота и/или доза, относящаяся к введению, может быть подобрана специалистом в данной области техники в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, комбинация (например, в форме фармацевтической композиции или составного набора) по настоящему изобретению может быть введена для лечения фиброзного заболевания в дозе для NTZ или аналога NTZ или агониста PPAR, такого как соединение формулы (I), или (II) или (III), составляющей от 0,01 до 4000 мг/день, например, от 50 до 2000 мг/день и, в частности, от 100 до 1000 мг/день.

Доза агониста(ов) PPAR в указанной комбинации может

варьироваться в зависимости от самого агониста PPAR. Доза подбирается к эффективности агониста PPAR.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения NTZ используют в комбинации с Элафибранором в дозе, составляющей от 100 мг/день до 1000 мг/день (такой как 1000 мг/день) (в частности, от 20 мг/день до 40 мг/день) для NTZ и от 80 до 120 мг/день для Элафибранора.

В другом предпочтительном варианте осуществления активные ингредиенты вводят в виде одной или нескольких фармацевтической(их) композиции(ий) в форме таблеток, предназначенных для перорального приема внутрь.

Введение может осуществляться ежедневно или даже несколько раз в день, если это необходимо.

Изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

ОПИСАНИЕ ФИГУР И ТАБЛИЦ

Фигура 1: Антифибротический эффект Элафибранора и Нитазоксанида в TGF β -индуцированных hHSC

Бессывороточные HSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с Элафибранором (А) или Нитазоксанидом (В) или Безафибратом (С) перед активацией с помощью профиброгенного цитокина TGF β 1 (1 нг/мл). После 48 часов инкубации экспрессию α -ГМА измеряли с помощью ELISA. Полученные значения трансформировали в проценты ингибирования по сравнению с контролем TGF β 1. Данные представлены как среднее (из трех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Обработку кривых и расчет половины максимальной ингибирующей концентрации (IC50) проводили с помощью программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

Фигура 2: Комбинация Элафибранора с Нитазоксанидом синергически ингибирует α -ГМА в TGF β 1-индуцированных hHSC

Комбинации тестировали в матричной форме "доза-эффект" и анализировали в соответствии с моделью приращения над аддитивизмом по Блисссу (EOB). Готовили серии разведений Элафибранора (ряд) и Нитазоксанида (столбец), включая их соответствующие контроли ДМСО. Полученные смеси добавляли к

бессывороточным HSC за 1 час до активации с помощью профиброгенного цитокина $TGF\beta 1$ (1 нг/мл). (А) Проценты ингибирования α -ГМА по сравнению с контролем $TGF\beta 1$ для всех пар комбинаций. Данные представлены в виде среднего из четырех повторений. (В) Показатели ЕОВ рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений с положительным значением ЕОВ считалась синергетической (от светло-серого до черного). Общий показатель ЕОВ, включающий все комбинации, также рассчитывали. (С) Значения данных, полученные от пары синергетической комбинации, наносили на график, представленный в виде гистограммы. Данные представлены как среднее (из четырех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Модель ЕОHSA использовали, как описано в разделе "Материалы и методы", для подтверждения синергизма выбранных пар комбинаций NTZ/ELA.

Фигура 3: Комбинация агонистов PPAR с Нитазоксанидом синергически ингибирует α -ГМА в $TGF\beta 1$ -индуцированные hHSC

Комбинации тестировали в матричной форме "доза-эффект" и анализировали в соответствии с моделью приращения над аддитивизмом по Блисссу (ЕОВ). Готовили серии разведений Сароглитазара, Селадельпара и Ланифибранора, и Нитазоксанида, включая их соответствующие контроли ДМСО. Полученные смеси добавляли к бессывороточным HSC за 1 час до активации с помощью профиброгенного цитокина $TGF\beta 1$ (1 нг/мл). Рассчитывали проценты ингибирования α -ГМА по сравнению с контролем $TGF\beta 1$ для всех пар комбинаций. Показатели ЕОВ рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений с положительным значением ЕОВ считалась синергетической (от светло-серого до черного).

(А) Сароглитазар (SARO)

(В) Селадельпар (SELA)

(С) Ланифибранор (LANI)

Проценты ингибирования α -ГМА по сравнению с контролем $TGF\beta 1$, полученные из пары синергетических комбинаций, наносили на график, представленный в виде гистограммы. Данные представлены

как среднее (из четырех повторений) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Модель EOHSA использовали, как описано в разделе "Материалы и методы", для подтверждения синергизма выбранных пар комбинаций.

Фигура 4: Содержание печеночного коллагена

6-недельные мыши C57BL/6 получали контрольную диету (CSAA), диету CDAA+1% холестерина (CDAAs) или диету CDAAs, дополненную NTZ (30 мг/кг/день или 100 мг/кг/день в течение 12 недель или Элафибраном (1 мг/кг/день или 3 мг/кг/день), или комбинацией Элафибранора и NTZ (соответственно 1+30 мг/кг/день, 1+100 мг/кг/день, 3+30 мг/кг/день и 3+100 мг/кг/день).

Для каждого графика указывали точное количество доз воздействия.

После умерщвления определяли содержание печеночного коллагена.

Фигура 5: Процент фиброза печени

6-недельные мыши C57BL/6 получали контрольную диету (CSAA), диету CDAA+1% холестерина (CDAAs) или диету CDAAs, дополненную NTZ (30 мг/кг/день или 100 мг/кг/день в течение 12 недель или Элафибраном (1 мг/кг/день или 3 мг/кг/день), или комбинацией Элафибранора и NTZ (соответственно 1+30 мг/кг/день, 1+100 мг/кг/день, 3+30 мг/кг/день и 3+100 мг/кг/день).

Для каждого графика указывали точное количество доз воздействия.

После умерщвления определяли площадь фиброза печени.

Фигура 6: Экспрессия гена α TMA в печени

Фигура 7: Экспрессия гена CCR2 в печени

Фигура 8: Экспрессия гена CCR5 в печени

Фигура 9: Экспрессия гена Colla2 в печени

Фигура 10: Экспрессия гена MMP2 в печени

Фигура 11: Экспрессия гена TIMP2 в печени

Фигура 12: Экспрессия гена TGF β 1 в печени

Аббревиатуры, используемые на фигурах, в таблицах и в тексте:

AP-1 Активирующий белок-1

ASBTi Ингибитор апикального натрий-созависимого

	переносчика желчных кислот
ASK1	Сигнал-регулирующая киназа 1
AT1	Ангиотензин 1
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких
CTGF	Фактор роста соединительной ткани
DGAT	Диацилглицерин-О-ацилтрансфераза
DMCO	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DPP4	Дипептидилпептидаза
ELISA	Иммуноферментный анализ
EOB	Приращение по Блиссу
FABAC	Конъюгат жирных кислот с желчными кислотами
FBS	Фетальная бычья сыворотка
FGF	Фактор роста фибробластов
FXR	Фарнезоидный X-рецептор
GDF	Фактор роста и дифференцировки
GLP-1	Глюкагоноподобный пептид-1
GPCR	Рецептор, сопряженный с G-белком
HBV	Вирус гепатита В
HCV	Вирус гепатита С
15-HEPE	5-гидроксиэйкозапентаеновая кислота
HIV	Вирус иммунодефицита человека
HSC	Звездчатая клетка печени
IC50	Половина максимальной ингибирующей концентрации
iNOS	Индукцибельная синтаза оксида азота
IPF	Идиопатический легочный фиброз
LANI	Ланифибранор
LBD	Лиганд-связывающий домен
LPS	Липополисахарид
LT	Лейкотриен
MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа
MMP-9	Металлопротеаза-9
MMPase	Металлопротеаза
NADPH	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NAFLD	Неалкогольная жировая дистрофия печени

NASH	Неалкогольный стеатогепатит
NF- κ B	Ядерный фактор каппа-B
NOX	NADPH-оксидаза
NSAIDs	нестероидные противовоспалительные средства
NTZ	Нитазоксанид
PAR	Протеазо-активируемый рецептор
PBC	Первичный билиарный холангит
PDE	Фосфодиэстераза
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста
PFIC3	Наследственный внутрипеченочный холестаза типа 3
PFOR	Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза
PPAR	рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
PPRE	Элементы ответа PPAR
PSC	Первичный склерозирующий холангит
ROCK	Rho-ассоциированная протеинкиназа
RTK	Рецепторная тирозинкиназа
SARO	Сароглитазар
SD	Стандартное отклонение
SELA	Селадельпар
SGLT	Натрий-глюкозный транспортер
STAT	Передачики сигнала и активаторы транскрипции
TGF β	Трансформирующий фактор роста- β
TGFBRI	рецепторы TGF β типа I
TGFBRII	рецепторы TGF β типа II
THBS1	Тромбоспондин-1
THR β	β -рецептор щитовидной железы
TIMP	Тканевый ингибитор металлопротеазы
TLR-4	Toll-подобный рецептор 4
TZ	Тизоксанид
TZG	Тизоксанида глюкуронид
VAP-1	Сосудистый адгезивный белок-1

ПРИМЕРЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, Fluka

кат. № 41640). Нитазоксанид (INTERCHIM кат. № RQ550U), Тизоксанид (INTERCHIM кат. № RP253), Ланифибранор (ARK PHARM кат. № AK689102), Селадельпар (ARK PHARM кат. № AK689146) и Сароглитазар (CHEMEXPRESS кат. № YY-1997A) получали коммерческим путем.

Культивирование hHSC

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Innoprot) культивировали в среде STeCM (ScienCell кат. № 5301), в которую добавляли 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS, ScienCell кат. № 0010), 1% пенициллина/стрептомицина (ScienCell кат. № 0503) и добавку для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell кат. № 5352). Флаконы для культивирования клеток покрывали поли-L-лизинном (Sigma кат. № P4707) для лучшей адгезии.

Получение композиций

2-х компонентная комбинационная матрица (NTZ/Элафибранор)

Для этих экспериментов составляли матрицу методом "шахматной доски". Исходные растворы NTZ/Элафибранор серийно разводили в ДМСО в 5-точечной серии подряд (агонист PPAR Элафибранор) и в 6-точечной серии в колонке NTZ 96-луночного планшета или 384-луночного планшета. Впоследствии получали комбинационную матрицу 5×6 путем смешивания 1:1 всех концентраций отдельно взятого агента. Тестовые концентрации для каждого соединения выбирали на основании соответствующей IC₅₀ каждого соединения в качестве отдельно взятого агента, полученной путем измерения содержания α-TMA в модели HSC, стимулированной с помощью TGF-β1.

Затем выбирали в 2 раза и в 4 раза более высокие и более низкие концентрации.

Активация hHSC с помощью TGF-β1 и лечение соединением

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Innoprot) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем клетки высевали с плотностью 2×10^4 клеток/лунка в 96-луночные планшеты и 6500 клеток/лунка в 384-луночные планшеты для измерения α-TMA с помощью ELISA. На следующий день клеточную

культуральную среду удаляли, и клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (Invitrogen кат. № 14190). hHSC депривировали в течение 24 часов в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде.

Для обработок с помощью NTZ, Элафибранора или других агонистов PPAR и соответствующих комбинаций NTZ/Элафибранора или агонистов PPAR, бессывороточные hHSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями с последующим добавлением профиброгенных стимулов TGF- β 1 (PeproTech кат. № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS в течение дополнительных 48 часов.

Иммуноферментный анализ (ELISA) α -ГМА

Уровень α -ГМА измеряли с помощью сэндвич-варианта ELISA. Вкратце, лунки планшета ELISA сначала покрывали иммобилизованным антителом (мышинное моноклональное анти-АСТА2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в ФСБ+0,2% Твин 20 в течение одного часа добавляли блокирующий раствор, состоящий из ФСБ+0,2% БСА, после чего следовал еще один цикл промывки. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом в течение 2ч при комнатной температуре. После процедуры промывки добавляли идентифицирующее антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-АСТА2, Abnova) в течение 2 часов при комнатной температуре с последующим 3 промывками. Для обнаружения сначала применяли HRP-конъюгированный Стрептавидин (R&D Systems кат. № DY998) в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки добавляли субстрат ТМВ для HRP (BD, № 555214) и инкубировали в течение 7 минут при комнатной температуре в темноте. При окислении ТМВ образует водорастворимый синий продукт реакции, который становится желтым с добавлением серной кислоты (стоп-раствор), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм с использованием спектрофотометра. Проявленный цвет прямо пропорционален количеству α -ГМА, присутствующему в лизате.

Определение синергизма методом приращения по Блисссу (EOB) и подтверждение с помощью EOSHA (приращение над максимумом отдельно взятого агента)

Значения, полученные в анализах ELISA α TMA, сначала трансформировали в проценты ингибирования по сравнению с контролем TGF- β 1. Затем, используя эти проценты ингибирования, определяли EOB (приращение по Блисссу) для установления синергетического эффекта комбинаций лекарственных средств. Ожидаемый показатель аддитивизма по Блисссу (E) сначала определяли по формуле:

$E = (A+B) - (A \times B)$, где A и B – процент ингибирования NTZ (A) и Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара или Ланифибранора (B) в данной дозе. Разница между ожиданием по Блисссу и наблюдаемым ингибированием комбинированных NTZ/Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара или Ланифибранора в одной и той же дозе представляет собой показатель "приращение по Блисссу".

Показатель "приращение по Блисссу" = 0 указывает на то, что комбинированное лечение является аддитивным (как и ожидалось для эффектов независимых путей воздействия);

Показатель "приращение по Блисссу" > 0 указывает на активность, превышающую аддитивную (синергизм); и

Показатель "приращение по Блисссу" < 0 указывает на то, что активность комбинации меньше аддитивной (антагонизм).

Для комбинации NTZ+Элафибранор рассчитывали дополнительный общий показатель по Блисссу суммированием всех EOB.

EOHSA является стандартной оценкой синергизма, используемой Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для оценки комбинаций лекарственных средств, и рассчитывается как разница эффекта, производимого комбинацией лекарственных средств, и наибольшего эффекта, производимого каждым из отдельно взятых агентов комбинации в тех же концентрациях, что и при комбинировании (Borisy с соавт., 2003). Для синергетических комбинаций, идентифицированных методом EOB, экспериментальный % ингибирования наносили на график, представленный в виде гистограммы, и значимость наблюдаемых различий между NTZ/EIA и отдельно взятым агентом оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и ретроспективного

нескорректированного анализа методом наименьшей значимой разности по Фишеру (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Оценка Элафибранора, Нитазоксанида и комбинации Элафибранор+Нитазоксанид в хронической модели CDAA+1% холестерина при фиброзе NASH (12 недель)

План эксперимента

Ограниченная L-аминокислотами диета с дефицитом холина (CDAA) не содержит холина, который необходим для β -окисления в печени и выработки липопротеинов очень низкой плотности, и, как полагают, стимулирует гепатоциты накапливать жир и впоследствии вызывать повреждение клеток. Модель грызунов, индуцированная диетой CDAA, развивает фиброз в течение относительно короткого периода времени, что идеально подходит для быстрого изучения обратимости патологии NASH, особенно фиброза.

Повышенное потребление холестерина ускоряет фиброз печени в нескольких мышинных моделях NASH. Обострение фиброза печени в основном включает накопление свободного холестерина в звездчатых клетках печени, что повышает чувствительность клеток к трансформирующему фактору роста β (TGF β) и впоследствии усугубляет фиброз печени.

В настоящем исследовании мы исследовали влияние нитазоксанида на фиброз печени у мышей C57Bl/6J, получавших диету CDAA, дополненную 1% холестерина.

Профилактические эффекты отдельно взятого Элафибранора, отдельно взятого NTZ и их комбинации оценивали в модели фиброзирующего NASH у мышей, получавших диету CDAA+1% холестерина. Самцы мышей C57Bl/6J в возрасте 6 недель получали контрольную диету (CSAA), диету CDAA+1% холестерина или диету CDAA+1% холестерина, дополненную Элафибранором 1 и 3 мг/кг/день, NTZ 30 и 100 мг/кг/день или комбинированными лекарственными средствами (Элафибранор 1 и 3 мг/кг/день в сочетании с NTZ 30 и 100 мг/кг/день) в течение 12 недель.

Массу тела и потребление пищи контролировали дважды в неделю. В последний день лечения мышей умерщвляли после 6-часового периода голодания. Печень быстро хирургически удаляли

для биохимических и гистологических исследований.

Все манипуляции с животными выполняли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями для правильного ухода и использования лабораторных животных.

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте 6 недель кормили в течение 12 недель в соответствии с планом эксперимента, подробно приведенным в таблице 1:

Диета	Соединение	Доза мг/кг/день	Количество мышей
CSAA			8
			12
	Элафибранор	1	8
		3	8
CDAА+1% холестерина	NTZ	30	8
		100	8
	Элафибранор+NTZ	1+30	8
		1+100	8
		3+30	8
		3+100	8

Таблица 1: План эксперимента

Контролем служила диета CSAA.

Некоторые мыши получали диету CDAАс.

Некоторые мыши получали диету CDAАс, дополненную Элафибранором в дозе 1 или 3 мг/кг/день.

Некоторые мыши получали диету CDAАс, дополненную NTZ в дозе 30 или 100 мг/кг/день.

Некоторые мыши получали диету CDAАс, дополненную комбинацией Элафибранор+NTZ, в различных соотношениях: 1+30, 1+100, 3+30 и 3+100 мг/кг/день.

Группу, соответствующую диете CDAАс, дополненной NTZ в дозе 30 мг/кг, также называют мышами C57Bl/6J, получавшими диету CDAА+0,02% (масс./масс.) нитазоксанида, что соответствует теоретической дозе 30 мг/кг/день.

Группу, соответствующую диете CDAАс, дополненной NTZ в дозе 100 мг/кг, также называют мышами C57Bl/6J, получавшими диету

CDAA+0,0667% (масс./масс.) нитазоксанида, что соответствует теоретической дозе 100 мг/кг/день.

Корм приобретали у компании Ssniff® (Зоест, Германия).

Нитазоксанид (см. стандартный образец в Таблице 1) был включен Ssniff® в диету CDAA+1% холестерина в порошкообразной форме до необходимой дозы.

Стандартный образец и номер партии нитазоксанида приведены в таблице Таблицы 2:

Таблица 2: Стандартные образцы нитазоксанида

Соединение (МНН)	Лабораторный код		Поставщик	Стандартный образец	Партия
	Внешний идентификатор	Идентификатор в Genfit			
Нитазоксанид	GFE 50455	GSL022597.08	Interchim	RQ550	1505

Для каждой дозы выполняли расчет точных доз в соответствии со следующим примером. Это позволяет учитывать точную дозу каждого продукта, который точно потреблялся каждой группой мышей.

Расчет фактических лечебных доз: пример с 0,02% (масс./масс.) нитазоксанида

Потребление пищи выражается в граммах пищи/грамм животного/день

0,02% нитазоксанида в рационе

0,02 г соединения/100 г пищи=0,2 мг соединения/г пищи

Фактическая доза соединения:

0,2 мг соединения/грамм пищи/грамм животного/день

$(0,2 \text{ мг соединения/грамм пищи/грамм животного/день}) \times 1000 = (0,2 \text{ мг соединения/грамм пищи/кг животного/день}) = 200 \text{ мг соединения/грамм пищи/кг животного в день}$

Следовательно, умножая на 200 значение потребления пищи, выраженное в граммах пищи/граммы животного/день; Полученное значение соответствует фактической введенной дозе, выраженной в мг NTZ/кг животного/день.

Таким же образом:

Для дозы NTZ 0,00667% масс./масс. фактическую лечебную дозу получали путем умножения величины потребления пищи (граммов пищи/граммы животного/день) на 66,7.

Для дозы NTZ 0,0667% масс./масс. фактическую лечебную дозу получали путем умножения величины потребления пищи (граммов пищи/граммы животного/день) на 667.

Согласно расчету рассчитанные дозы в сравнении с планируемыми дозами приведены в следующих таблицах 3 и 4.

Группы	GFT505		NTZ	
Планируемые дозы	1 мг/кг	3 мг/кг	30 мг/кг	100 мг/кг
Рассчитанные дозы	1 мг/кг	2,8 мг/кг	26,3 мг/кг	78,1 мг/кг

Таблица 3: Планируемые и рассчитанные дозы для каждого соединения в различных дозах

Группы	Комбинация 1		Комбинация 2		Комбинация 3		Комбинация 4	
	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ
Планируемые дозы	1 мг/кг	30 мг/кг	1 мг/кг	100 мг/кг	3 мг/кг	30 мг/кг	3 мг/кг	100 мг/кг
Рассчитанные дозы	0,9 мг/кг	26,4 мг/кг	0,9 мг/кг	79,4 мг/кг	2,9 мг/кг	27,4 мг/кг	2,8 мг/кг	77,7 мг/кг

Таблица 4: Планируемые и рассчитанные дозы для каждой комбинации в разных дозах

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

В конце периода лечения животных анестезировали изофлураном и отбирали образцы крови, как описано ниже. Затем животных умерщвляли путем смещения шейных позвонков и обезглавливали для удаления мозга и взвешивания. Печень также собирали и взвешивали. Часть печени фиксировали в 4% формалине, заливали в парафин и использовали для гистологических анализов. Оставшуюся печень быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до использования для дальнейших анализов.

Забор крови производили на стадии умерщвления подопытного животного после 6-часового периода голодания. Образцы крови изымали под анестезией посредством ретро-орбитальной пункции. Гепариновые пробирки, содержащие кровь, быстро центрифугировали (15 минут при 4000 об/мин/ 4°C) и собирали фракцию плазмы. Аликвоты плазмы хранили при -20°C до дальнейшего анализа.

Биохимия плазмы

Аланинаминотрансфераза (ALT)

Концентрацию ALT в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автомата Daytona (Randox, кат. № AL 3801). Вкратце, ALT в образце плазмы ферментативно превращает α -оксоглутарат и L-аланин в L-глутамат и пируват. В присутствии NADH, образующийся пируват превращается лактатдегидрогеназой с образованием L-лактата и NAD^+ . Кинетика реакции изучена и позволяет рассчитать уровень ALT в плазме. Результаты выражены в U/л.

Аспартатаминотрансфераза (AST)

Концентрацию AST в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автомата Daytona (Randox, кат. № AS 3804). Вкратце, AST в образце плазмы ферментативно превращает α -оксоглутарат и L-аспартат в L-глутамат и оксалоацетат. В присутствии NADH образующийся оксалоацетат превращается малатдегидрогеназой с образованием L-малата и NAD^+ . Кинетика реакции изучена и позволяет рассчитать уровни AST в плазме. Результаты выражены в U/л.

Гистология

При умерщвлении подопытных животных образцы печени обрабатывали для гистологического анализа и исследовали следующим образом.

Заливка тканей и изготовление срезов

Срезы печени сначала фиксировали в течение 12 часов в 4% растворе формалина. Затем кусочки печени промывали 30 минут в ФСБ и дегидратировали в этанольных растворах (последовательные ванны с 70, 80, 95 и 100% этанолом). Кусочки печени инкубировали в трех разных ваннах с ксилолом (Sigma-Aldrich кат. № 534056), а затем в двух ваннах с жидким парафином (60°C). Затем кусочки печени помещали на стеллажи, которые аккуратно заполняли Histowax®, чтобы полностью покрыть ткань.

Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, удаляли со стеллажей и хранили при комнатной температуре. Блоки печени разрезали на кусочки по 3 мкм.

Красное окрашивание пикросириусом

Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и

инкубировали в течение 15 минут в растворе 0,04% Fast Green FCF (Sigma-Aldrich, кат. № F7258) перед промывкой в ванне с 0,5% уксусной кислотой (Sigma-Aldrich, кат. № 695092). Затем срезы печени промывали в воде и инкубировали 30 минут в растворе Fast Green FCF 0,04% – 0,1% сириуса красного (Direct Red 80, Fluka кат. № 43665) в насыщенной водной пикриновой кислоте (Sigma-Aldrich кат. № P6744). Затем срезы обезвоживали и заключали с использованием среды CV Mount (Leica, кат. № 14046430011).

Гистологические исследования

Лаборант, не видящий источник каждого образца печени, проводил гистологические исследования. Виртуальные слайды создавали с использованием сканера Pannoramic 250 от 3D Histech. Используя программное обеспечение Quant Center (3D Histech, включая модули Pattern Quant и Histo Quant), количественно определяли области окрашенного коллагена. Вкратце, Pattern Quant использовали для обнаружения ткани и измерения ее поверхности. Затем Histo Quant использовали для определения содержания окрашенного коллагена и измерения его поверхности на основе метода цветового порога. Площадь фиброза затем выражали в процентах поверхности коллагена относительно всей ткани для каждого животного.

Определение стадии фиброза печени оценивали "слепым" методом, используя критерии фиброза CRN.

Подробная информация о параметрах, количественной оценке/подсчете и количестве рассматриваемых областей представлена в следующей таблице 5.

Параметр	Баллы по шкале	Описание (рассматривали весь срез)
Фиброз	0	Нет фиброза
	1	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз или порталный/перипортальный фиброз
	2	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и

		портальный/перипортальный фиброз
	3	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и/или портальный фиброз с фокальным или распространенным мостовидным фиброзом
	4	Цирроз

Таблица 5: Критерии CRN для фиброза

Статистический анализ

Экспериментальные результаты выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) и наносили на график в виде гистограмм или кривых. Статистический анализ выполняли с использованием Prism Version 7 следующим образом:

Для измерений, выполняемых после умерщвления подопытного животного, сравнивали группы CSAA и CDAA+1% холестерина посредством t-критерия Стьюдента (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) или посредством критерия Манна-Уитни (\$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$: $p < 0,001$). Группы лечения сравнивали с получающими диету CDAA+1% холестерина с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и ретроспективного нескорректированного анализа методом наименьшей значимой разности по Фишеру (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Измерение содержания печеночного коллагена

Содержание коллагена в печени определяли с использованием соответствующего набора QuickZyme (анализ общего коллагена, кат. № QZB-totcol5). Анализ основан на обнаружении гидроксипролина, который является непротеиногенной аминокислотой, находящейся главным образом в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в гидролизатах ткани может быть использован в качестве прямой меры количества коллагена, присутствующего в ткани (без установления различия между проколлагеном, зрелым коллагеном и продуктами распада коллагена).

Полный гидролиз образцов ткани в 6M HCl при 95°C требуется перед введением дозы гидроксипролина. В результате анализа

образуется хромоген с максимумом поглощения при 570 нм. Результаты выражены в мг коллагена/г печени.

N-концевой пропептид проколлагена III (PIIINP)

Концентрацию PIIINP в плазме определяли с использованием анализа ELISA от Cloud-Clone Corp (кат. № SEA573Ra) в соответствии с инструкциями производителя. Планшет для микротитрования предварительно покрывают антителом, специфичным к PIIINP. Стандарты или образцы добавляют в соответствующие лунки планшета для микротитрования с биотин-конъюгированным антителом, специфичным к PIIINP. Затем в каждую лунку микропланшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. После добавления раствора субстрата ТМВ только те лунки, которые содержат PIIINP, биотин-конъюгированное антитело и фермент-конъюгированный авидин, будут иметь изменение цвета. Реакцию фермент-субстрат завершают добавлением раствора серной кислоты, и изменение цвета измеряют спектрофотометрически на длине волны $450 \text{ нм} \pm 10 \text{ нм}$. Концентрацию PIIINP в образцах затем определяют путем сравнения оптической плотности (OD) образцов со стандартной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Экспрессия генов

Извлечение РНК

Общую РНК печени выделяли с использованием набора Nucleospin® 96 (Macherey Nagel) в соответствии с инструкциями производителя. 150 нг общей РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV-RT (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони) (Invitrogen кат. № 28025) в присутствии 1× буфера обратной транскриптазы (RT) (Invitrogen кат. № P/NY02321), 1 мМ ДТТ (Invitrogen кат. № P/NY00147), 0,5 мМ дНТФ (Promega), 200 нг рdN6 (Roche кат. № 11034731001) и 40U ингибитора рибонуклеазы (Promega кат. № N2515).

Затем проводили количественную ПЦР с использованием системы обнаружения ПЦР в режиме реального времени CFX96 Touch™ (Biorad). Вкратце, реакции ПЦР проводили в 96-луночных планшетах на 5 мкл 5× разбавленной смеси для обратной транскрипции с

использованием набора iQ SYBR Green Supermix (Biorad кат. № 170887). Условия эксперимента представляли собой: 20 мкл объемной реакции и 0,5 мкл каждого из обратных и прямых праймеров (10 пМоль).

Название праймера	Идентификатор (ID) последовательности	Последовательность (5'→3')
αГМА прямой	1	CTGACAGAGGCACCACTGAA
αГМА обратный	2	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col1α1 прямой	3	AGGCGAACAAGGTGACAGAG
Col1α1 обратный	4	GCCAGGAGAACCAGCAGAG
Col1α2 прямой	5	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG
Col1α2 обратный	6	TTTGCCCCCAGGTATGCCAG
TGFβ1 прямой	7	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA
TGFβ1 обратный	8	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TIMP1 прямой	9	ATTCAAGGCTGTGGGAAATG
TIMP1 обратный	10	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TIMP2 прямой	11	GCATCACCCAGAAGAAGAGC
TIMP2 обратный	12	GGGTCCTCGATGTCAAGAAA
MMP2 прямой	13	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC
MMP2 обратный	14	GCTTCCAAACTTCACGCTCT
MMP7 прямой	15	TAATTGGCTTCGCAAGGAGA
MMP7 обратный	16	AAGGCATGACCTAGAGTGTTC
CCR2 прямой	17	TAATATGTTACCTCAGTTCATCCACGG
CCR2 обратный	18	TGCTCTTCAGCTTTTACAGCSTATC
CCR5 прямой	19	ATTCTCCACACCCGTGTTTCG
CCR5 обратный	20	GAATTCCTGGAAGGTGGTCA
GAPDH прямой	21	TATGACTCCACTCACGGCAA
GAPDH обратный	22	TCCACGACATACTCAGCACC

Уровни экспрессии нормализовывали с использованием экспрессии гена GAPDH в качестве эталона.

Для каждого гена строили стандартную кривую путем выбора лучших точек (по меньшей мере трех точек), чтобы эффективность реакции ПЦР была близка к 100%, а коэффициент корреляции был близок к 1. Уровни экспрессии определяли с использованием уравнения стандартной кривой как для гена "домашнего хозяйства",

так и целевого гена (с учетом эффективности специфической ПЦР каждого целевого гена).

Результаты и выводы:

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов характерна для многих фиброзных заболеваний.

После повреждения печени покоящиеся HSC подвергаются процессу активации, который характеризуется дифференцировкой в (α -ГМА)-позитивные миофибробласты.

Было показано, что NTZ в монотерапии обеспечивает антифиброзную активность в TGF β -индуцированных hGSC (фиг.1B). Поскольку известно, что NTZ быстро гидролизует до своего активного метаболита тизоксанида (TZ) (Broekhuysen, Stockis с соавт., 2000), этот метаболит также оценивали на его антифибротическую активность в HSC. TZ показал профиль, аналогичный исходному лекарственному средству (данные не показаны). С другой стороны, некоторые агонисты PPAR, такие как Элафибранор, также показали антифибротический профиль в TGF β -индуцированной модели HSC (фиг.1A). Другие агонисты PPAR, такие как беафибрат, показали слабую активность, что позволяет предположить, что агонисты PPAR не являются эквивалентными в отношении их антифибротических свойств (фиг.1C).

Чтобы оценить, может ли комбинация Элафибранора с NTZ синергетически облегчать фиброз, эксперименты с комбинационными матрицами проводили в TSCF-индуцированных HSC. Вкратце, растворы NTZ и Элафибранора серийно разбавляли в формате "шахматной доски", составляя матрицу из 42 комбинаций, охватывающую большую панель соотношений Элафибранора/NTZ. Синергия сначала определяли путем расчета показателей "приращение по Блисссу". Эти эксперименты показали, что NTZ может синергетически взаимодействовать с Элафибранором для снижения продукции α -ГМА в активированных HSC. Несколько комбинационных пар продемонстрировали показатель EOB более 10, что свидетельствует о синергизме (фиг.2B).

Для подтверждения синергизма экспериментальные значения, соответствующие верхнему показателю EOB, наносили на гистограмму

(фиг.2С). Эти графики показывают, что комбинация NTZ с Элафибраном демонстрирует превосходящий антифиброзный эффект, который является статистически значимым по сравнению с наибольшим эффектом отдельно взятого агента (NTZ или Элафибранора). Наиболее впечатляющий пример представлен комбинационной парой NTZ в концентрации 0,6 мкМ и Элафибранора в концентрации 5 мкМ. Хотя NTZ практически не проявляет антифибротическую активность при 0,6 мкМ, добавление Элафибранора при 5 мкМ приводит к сильному снижению α ГМА на 55%, что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый только для отдельно взятых агентов.

Чтобы оценить, может ли комбинация других агонистов PPAR, Сароглитазара, Селадельпара и Ланифибранора с NTZ, синергетически облегчать фиброз, эксперименты с комбинационной матрицей также проводили в TSC- β -индуцированных HSC и определяли показатель ЕОВ. Для оценки синергизма комбинации NTZ с Сароглитазаром, Селадельпаром и Ланифибранором проверяли на антифиброзные свойства. Комбинация NTZ с Сароглитазаром, Селадельпаром или Ланифибранором продемонстрировала показатель ЕОВ >0, что свидетельствует о синергизме. Комбинация Сароглиатзара в концентрации 2,5 мкМ и NTZ в концентрации 0,625 мкМ также приводит к сильному снижению α ГМА на 52%, что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый для агентов в монотерапии (фиг.3А). Комбинация Селадельпара в концентрации 20 мкМ и NTZ в концентрации 2,5 мкМ также приводит к сильному снижению α ГМА на 72%, что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый для агентов в монотерапии (фиг.3В). В меньшей степени комбинация Ланифибранора в концентрации 10 мкМ и NTZ в концентрации 1,25 мкМ имеет тенденцию быть значимой ($p=0,06$) для снижения продукции α -ГМА в активированных HSC по сравнению с NTZ (фиг.3С).

В заключение, заявитель обнаружил неожиданные антифибротические активности для комбинации соединения формулы (I) со специфическим агонистом(ами) PPAR. Эти результаты предполагают, что комбинация соединения формулы (I) с агонистом PPAR может быть синергетической и может обеспечивать

терапевтические преимущества при множественных типах фиброзных заболеваний.

Применение по отношению к мышам диеты с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот (CDAA)+1% холестерина вызывает прогрессирующий фиброзный стеатогепатит, который патологически сходен с неалкогольным стеатогепатитом человека (NASH).

Диета CDAA+1% холестерина, в частности, вызывает значительное увеличение печеночного коллагена, как показано на фигуре 4.

Эта фигура также демонстрирует, что введение Элафибранора или NTZ в монотерапии снижает содержание печеночного коллагена. Снижение коллагена пропорционально введенной дозе Элафибранора или NTZ.

Когда вводят комбинацию Элафибранора и NTZ, снижение продуцируемого коллагена больше, чем снижение, наблюдаемое для каждого соединения, взятого отдельно.

Следовательно, имеет место синергетический эффект комбинации Элафибранора и NTZ на снижение выработки коллагена. Другими словами, наблюдается заметный антифиброзный эффект при комбинации Элафибранора и NTZ.

Лучший эффект наблюдается для комбинации, содержащей Элафибранор в концентрации 2,8 мг/кг (мг на килограмм) и NTZ в концентрации 77,7 мг/кг, выраженный в рассчитанных дозах.

На фигуре 5 представлены результаты, полученные с помощью гистологии, то есть определения площади фиброза, которую выражали в процентах поверхности коллагена ко всей ткани для каждого животного.

Диета CDAA+1% холестерина, в частности, вызывает значительное увеличение процента фиброза.

На фигуре 5 также показано, что введение Элафибранора или NTZ в монотерапии снижает процент фиброза. Снижение пропорционально введенной дозе Элафибранора или NTZ.

Когда вводят комбинацию Элафибранора или NTZ, снижение процента фиброза больше, чем снижение, наблюдаемое для каждого соединения, взятого отдельно.

Следовательно, имеет место синергетический эффект

комбинации Элафибранора и NTZ на снижение процента фиброза. Другими словами, наблюдается заметный антифиброзный эффект при комбинации Элафибранора и NTZ.

Лучший эффект наблюдается для комбинации, содержащей Элафибранор в концентрации 2,8 мг/кг (мг на килограмм) и NTZ в концентрации 77,7 мг/кг, выраженный в рассчитанных дозах.

Фигуры 6-12 изображают экспрессию генов различных маркеров печеночного фиброза. Для всех маркеров диета CDAA+1% холестерина, в частности, вызывает значительное увеличение экспрессии генов.

Можно также отметить, что введение Элафибранора или NTZ в монотерапии снижает уровень экспрессии различных генов. Снижение пропорционально введенной дозе Элафибранора или NTZ.

Когда вводят комбинацию Элафибранора и NTZ, снижение экспрессии генов больше, чем снижение, наблюдаемое для каждого соединения, взятого отдельно.

Следовательно, имеет место синергетический эффект комбинации Элафибранора и NTZ на снижение экспрессии генов различных маркеров печеночного фиброза. Другими словами, наблюдается заметный синергетический антифиброзный эффект при комбинации Элафибранора и NTZ.

В заключение, заявитель обнаружил неожиданную синергическую антифибротическую активность для комбинации соединения формулы (I) со специфическим агонистом(ами) PPAR. Эти результаты предполагают, что комбинация соединения формулы (I) с агонистом PPAR может быть синергетической и/или может иметь дополнительные эффекты, а также может обеспечивать терапевтические преимущества при множественных типах фиброзных заболеваний.

ССЫЛОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Broekhuysen, J., A. Stockis, et al. (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(8):387-394. Borisy, A.A., Elliott, P.J., Hurst, N.W., Lee, M.S., Lehar, J., Price, E.R., Serbedzija, G., Zimmermann, G.R., Foley, M.A., Stockwell, B.R., Keith C.T. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jun 24; 100(13):7977-82. de Carvalho, L.P.S., C.M. Darby, et al. (2011). "Nitazoxanide disrupts

membranepotentialandintrabacterialpHhomeostasisofMycobacteriumtuberculosis."ACS Med. Chem. Lett. 2 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS) .All Rights Reserved.) :849-854.

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

21. Dubreuil, L., I. Houcke, et al. (1996) . "In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms." Antimicrob. Agents Chemother. 40 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS) .All Rights Reserved.) :2266-2270.

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

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

1180. Hemphill, A., J. Mueller, et al. (2006) . "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections." Expert Opin. Pharmacother. 7 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS) .All Rights Reserved.) :953-

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

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

2840. Pankuch, G.A. and P.C. Appelbaum (2006) . "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species." Antimicrob. Agents Chemother. 50 (Cop

yright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1112-1117. Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." *Antiviral Res.* 110 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 94-103. Rossignol, J. F. and R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S. P. R. L. Phavic, Belg.. 11pp. Rossignol, J. F. and H. Maisonneuve (1984). "Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nanai* infections." *Am J Trop Med Hyg* 33 (Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): 511-512.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENFIT

<120> ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

<130> B2428PC00

<160> 22

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> альфа-ГМА прямой

<400> 1
ctgacagagg caccactgaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> альфа-ГМА обратный

<400> 2
catctccaga gtccagcaca 20

<210> 3

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> Col1a1 прямой

<400> 3
aggcgaaca ggtgacagag 20

<210> 4

<211> 19

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> Col1a1 обратный

<400> 4
gscaggaaga ccagcagag 19

<210> 5

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>		
<223>	Col1a2 прямой	
<400>	5	
	attggaagcc gaggtcccaag	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	Col1a2 обратный	
<400>	6	
	tttgccccca ggtatgccag	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	TGFb1 прямой	
<400>	7	
	ttgcttcagc tccacagaga	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	TGFb1 обратный	
<400>	8	
	tggttgtaga gggcaaggac	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	TIMP1 прямой	
<400>	9	
	attcaaggct gtgggaaatg	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	TIMP1 обратный	

<400> 10	
ctcagagtac gccagggaac	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> искусственная	
<220>	
<223> TIMP2 прямой	
<400> 11	
gcatsacсса гаагааgac	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> искусственная	
<220>	
<223> TIMP2 обратный	
<400> 12	
gggtcctcga tgtcaагааа	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> искусственная	
<220>	
<223> MMP2 прямой	
<400> 13	
tccctaagct catcgсagac	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> искусственная	
<220>	
<223> MMP2 обратный	
<400> 14	
gcttcсааас ttcacgctct	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> искусственная	
<220>	
<223> MMP7 прямой	
<400> 15	
taattggctt cгсаaggаgа	20

<210>	16	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	ММР7 обратный	
<400>	16	
	aaggcatgac ctagagtgtt cc	22
<210>	17	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	CCR2 прямой	
<400>	17	
	taatatgtta cctcagttca tccacgg	27
<210>	18	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	CCR2 обратный	
<400>	18	
	tgctcttcag ctttttacag cstatc	26
<210>	19	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	CCR5 прямой	
<400>	19	
	attctccaca ccctgtttcg	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	
<220>		
<223>	CCR5 обратный	
<400>	20	
	gaattcctgg aaggtggtca	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	искусственная	

<220>
<223> GAPDH прямой

<400> 21
tatgactcca ctсacggсаа 20

<210> 22
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> GAPDH обратный

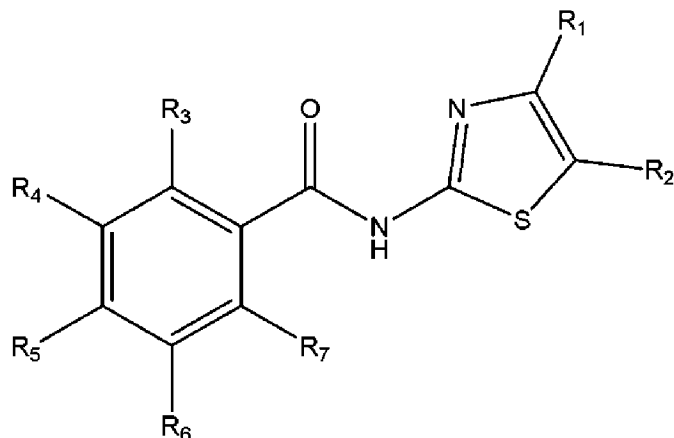
<400> 22
tccacgacat actcagcacc 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированный продукт, содержащий:

- (i) соединение, выбранное из NTZ и его аналога; и
- (ii) по меньшей мере, один агонист PPAR.

2. Комбинированный продукт по п.1, в котором компонент (i) представляет собой соединение формулы (I):



(I)

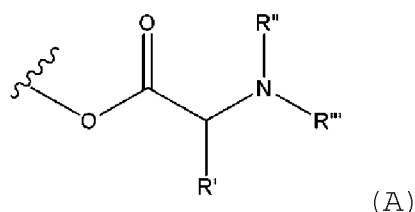
или его фармацевтически приемлемую соль, в которых:

R₁ представляет собой атом водорода (H), атом дейтерия (D), атом галогена, (C₆-C₁₄)арильную группу, гетероциклическую группу, (C₃-C₁₄)циклоалкильную группу, (C₁-C₆)алкильную группу, сульфонильную группу, сульфоксидную группу, (C₁-C₆)алкилкарбонильную группу, (C₁-C₆)алкилокси, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, группу NO₂, группу NH₂, (C₁-C₆)алкиламиногруппу, амидогруппу, (C₁-C₆)алкиламидогруппу, (C₁-C₆)диалкиламидогруппу.

R₂ представляет собой атом водорода, атом дейтерия, группу NO₂, (C₆-C₁₄)арильную группу, гетероциклическую группу, атом галогена, (C₁-C₆)алкильную группу, (C₃-C₁₄)циклоалкильную группу, (C₂-C₆)алкинильную группу, (C₁-C₆)алкилоксигруппу, (C₁-C₆)алкилтиогруппу, (C₁-C₆)алкилкарбонильную группу, (C₁-C₆)алкилкарбониламиногруппу, (C₆-C₁₄)арилкарбониламиногруппу, карбоксильную или карбоксилатную группу, амидогруппу, (C₁-C₆)алкиламидогруппу, (C₁-C₆)диалкиламидогруппу, группу NH₂, (C₁-C₆)алкиламиногруппу,

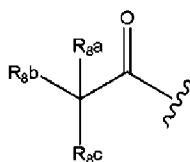
или R₁ и R₂ вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют замещенную или незамещенную 5-8-членную циклоалкильную, гетероциклическую или арильную группу,

R3 представляет собой атом водорода, атом дейтерия, атом галогена, группу O-R8, (C1-C6) алкилкарбонильную группу, (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилоксигруппу, (C1-C6) алкилтиогруппу, (C1-C6) алкилкарбонилксигруппу, (C6-C14) арилоксигруппу, (C6-C14) арильную группу, гетероциклическую группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, группу NO₂, сульфоаминоалкильную группу, группу NH₂, амина (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилкарбониламиногруппу, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкилалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или защитную группу азота.

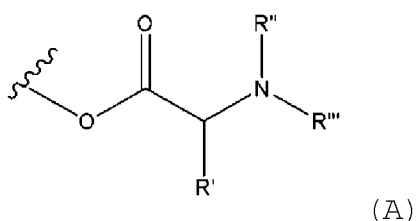
R8 представляет собой атом водорода, атом дейтерия или



группу, в которой R8a, R8b и R8c, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода или атом дейтерия.

R4, R5, R6 и R7, одинаковые или разные, представляют собой атом водорода, атом дейтерия, атом галогена, гидроксильную группу, (C1-C6) алкилкарбонильную группу, (C1-C6) алкильную

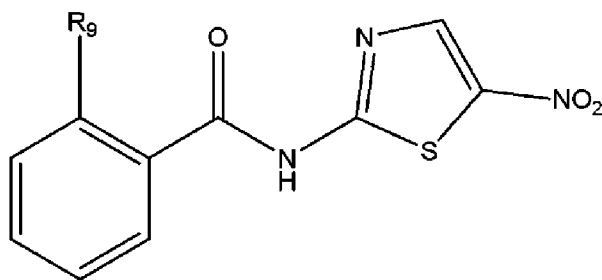
группу, (C1-C6) алкилоксигруппу, (C1-C6) алкилтиогруппу, (C1-C6) алкилкарбонилксигруппу, (C6-C14) арилоксигруппу, (C6-C14) арильную группу, гетероциклическую группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, NO₂, сульфониламино (C1-C6) алкильную группу, группу NH₂, амино (C1-C6) алкильную группу, (C1-C6) алкилкарбониламиногруппу, карбоксильную группу, карбоксилатную группу, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или защитную группу азота;

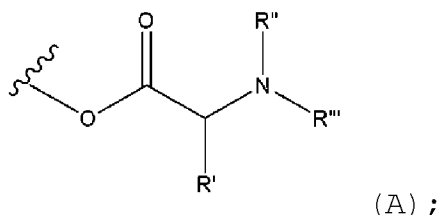
или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Комбинированный продукт по п.1 или 2, в котором компонент (i) представляет собой соединение формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, в которых R⁹ представляет собой атом водорода, атом дейтерия, группу O-R⁸ (R⁸ определен выше) или аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина, или фрагмент формулы (A):



где R' представляет собой (C1-C6) алкильную группу, (C2-C6) алкенильную группу, (C2-C6) алкинильную группу, (C3-C14) циклоалкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкил (C1-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C1-C6) алкильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкенильную группу, (C3-C14) циклоалкенил (C2-C6) алкинильную группу; R'' и R''' независимо представляют собой атом водорода, (C1-C6) алкильную группу или защитную группу азота

или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Комбинированный продукт по любому из пп.1-3, в котором компонент (i) выбран из нитазоксанида, тизоксанида, [(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d2) этаноата; или 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил) карбамоил]фенил (d1) этаноата, ((S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата гидрохлорида) и ((2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата гидрохлорида), или их фармацевтически приемлемой соли.

5. Комбинированный продукт по любому из пп.1-4, в котором компонент (ii) выбран из:

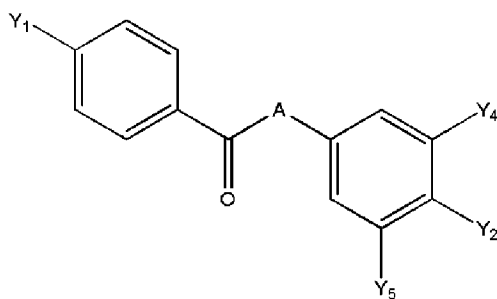
по меньшей мере одного агониста PPAR-альфа;

по меньшей мере одного агониста PPAR-гамма;

по меньшей мере одного агониста PPAR-дельта;
 по меньшей мере одного двойного агониста PPAR-альфа/дельта;
 по меньшей мере одного агониста PPAR-альфа и по меньшей мере одного агониста PPAR-дельта;
 по меньшей мере одного двойного агониста PPAR-альфа/гамма;
 по меньшей мере одного агониста PPAR-альфа и по меньшей мере одного агониста PPAR-гамма;
 по меньшей мере одного двойного агониста PPAR-гамма/дельта;
 по меньшей мере одного агониста PPAR-гамма и по меньшей мере одного агониста PPAR-дельта;
 по меньшей мере одного пан-агониста PPAR-альфа/гамма/дельта; и

по меньшей мере одного агониста PPAR-альфа, по меньшей мере одного агониста PPAR-гамма и по меньшей мере одного агониста PPAR-дельта.

6. Комбинированный продукт по любому из пп.1-5, в котором по меньшей мере один агонист PPAR представляет собой соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль:



(III)

в которых:

Y1 представляет собой галоген, группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу CH=CH или CH₂-CH₂;

Y2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga и Gb, одинаковые или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

Ra представляет собой атом водорода, незамещенную (C1-C6) алкильную группу, (C6-C14) арильную группу или (C1-C6) алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, (C1-C6) алкокси или (C1-C6) алкилтиогруппу, (C3-C14) циклоалкильные группы, (C3-C14) циклоалкилтиогруппы или

гетероциклические группы;

Rb представляет собой (C1-C6)алкильную группу, замещенную по меньшей мере группой -COORc, где Rc представляет собой атом водорода или (C1-C6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C3-C14)циклоалкильные группы или гетероциклические группы; и

Y4 и Y5, одинаковые или разные, представляют собой (C1-C6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C3-C14)циклоалкильные группы или гетероциклические группы.

7. Комбинированный продукт по любому из пп.1-6, в котором компонент (ii) выбран из Элафибранора, Селадельпара, Сароглитазара и Ланифибранора или их фармацевтической соли.

8. Комбинированный продукт по любому из пп.1-7, содержащий:

(i) соединение, выбранное из нитазоксанида, тизоксанида, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1) этаноата, ((S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата гидрохлорида) или ((2S,3S)-2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил-2-амино-3-метилпентаноата гидрохлорида); или из их фармацевтической соли; и

(ii) Элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.

9. Комбинированный продукт по любому из пп.1-8, где комбинированный продукт представляет собой композицию, содержащую компоненты i) и ii) и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Комбинированный продукт по любому из пп.1-9, где комбинированный продукт представляет собой набор частей, содержащих компоненты i) и ii) для последовательного, раздельного или одновременного применения.

11. Комбинированный продукт по любому из пп.1-10, дополнительно содержащий по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, выбранный из ингибиторов пирфенидона или рецепторной тирозинкиназы (RTKI), таких как Нинтеданиб, Сорафениб и другие

RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибиторов CTGF, или любого антифибротического соединения, чувствительного к препятствованию TGF β и BMP-активированных путей, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1, или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , Активин, ингибин, Нодаль, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие SMAD-белки, или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, Rho-подобные сигнальные пути GTPase, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/АКТ, TGF β -индуцированный процесс EMT, или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая Hh-лиганды или гены-мишени, или любые члены WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .

12. Комбинированный продукт по любому из пп.1-11, дополнительно содержащий по меньшей мере один терапевтически активный агент, выбранный из ингибиторов JAK/STAT и других противовоспалительных и/или иммунодепрессантных агентов.

13. Комбинированный продукт по п.12, в котором терапевтически активный агент выбран из глюкокортикоидов, НПВП, циклофосамида, нитрозомочевин, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пурина, аналогов пиримидина, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов сфингозин-1-фосфатных рецепторов, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и провоспалительные рецепторы цитокинов, Т-клеточный рецептор и интегрины.

14. Комбинированный продукт по любому из пп.1-13, в котором компоненты (i) и (ii) объединены в лекарственную форму в виде инъектируемой суспензии, геля, масла, пилули, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря

или средства галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

15. Комбинированный продукт по любому из пп.1-14 для применения в качестве лекарственного средства.

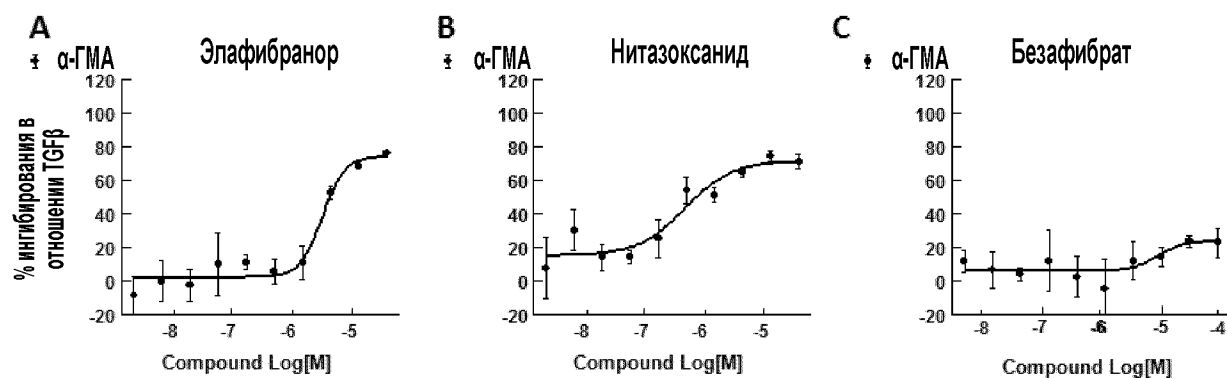
16. Комбинированный продукт по любому из пп.1-14 для применения в способе лечения воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания.

17. Комбинированный продукт по п.16, в котором фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичек, яичников, надпочечников, артерий, вен, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка, в частности фиброза печени, ЖКТ, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей, костного мозга, кишечника и суставов.

18. Комбинированный продукт по п.16, в котором заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), обусловленных действием лекарственного средства заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, индуцированных возбудителем инфекции заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, обусловленных нарушением функции иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC) и первичный билиарный холангит (PBC).

По доверенности

ФИГ. 1



ФИГ. 2

А Экспериментальный % ингибирования

		Нитазоксанид							
		[мкМ]	0	0,31	0,6	1	2,50	5	10
Элафибранор	0	0	0	0	6	22	47	70	
	1,25	0	10	17	30	49	59	72	
	2,5	10	15	31	49	53	66	74	
	5	23	48	55	59	66	68	76	
	10	46	60	61	64	63	67	75	
	20	62	67	68	65	68	71	74	

% Ингибирования

Минимальный

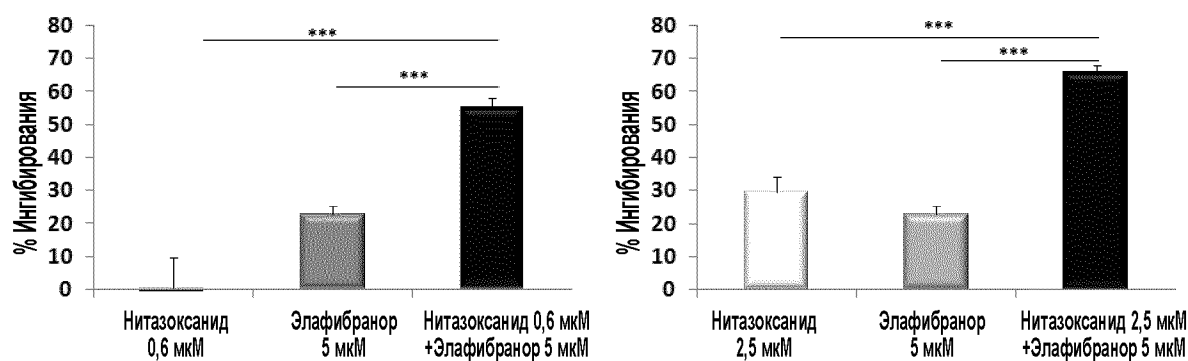
Максимальный

В Приращение по Блиссу

		Нитазоксанид							
		[мкМ]	0	0,31	0,63	1,25	2,5	5	10
Элафибранор	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,25	-	10	17	24	27	11	2	
	2,5	-	5	21	33	23	14	1	
	5	-	26	32	31	26	9	-1	
	10	-	14	15	15	5	-4	-9	
	20	-	5	6	1	-2	-9	-15	

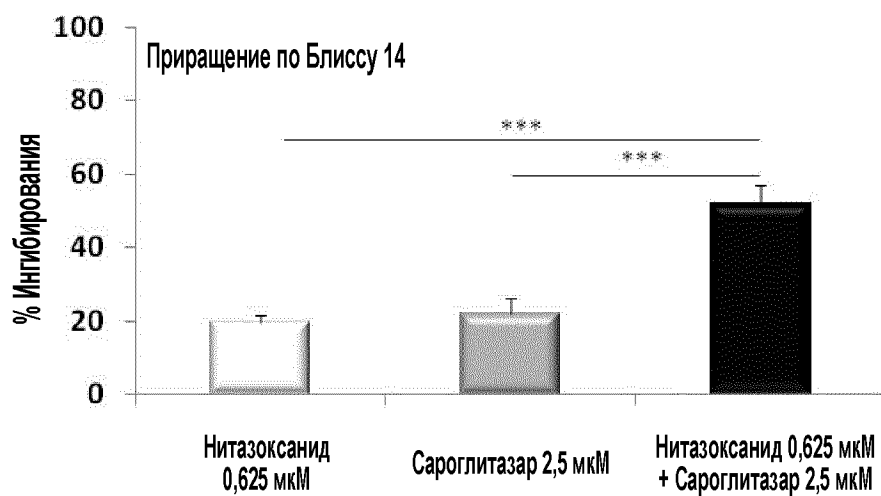
Общий показатель EOB 334

Минимальный Максимальный

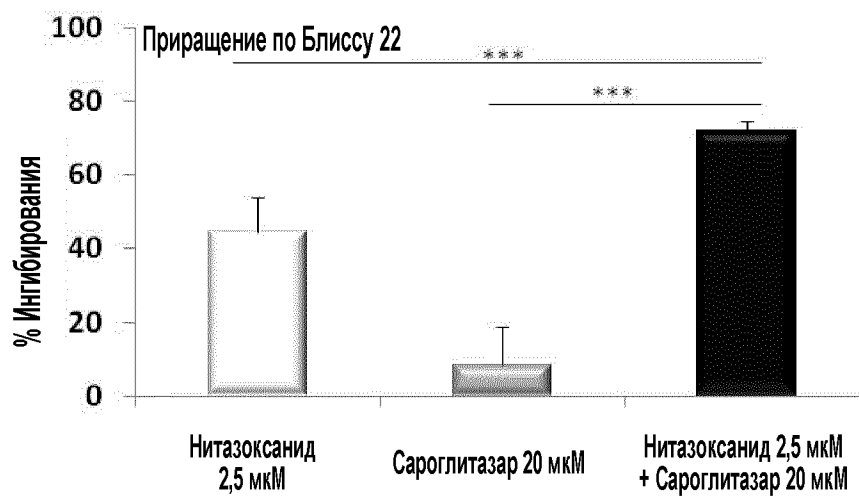
С Экспериментальный % ингибирования

ФИГ. 3

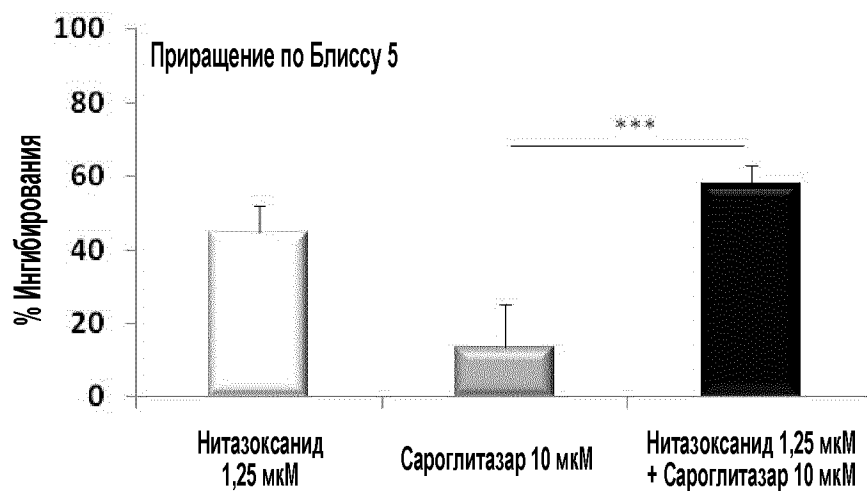
А



В

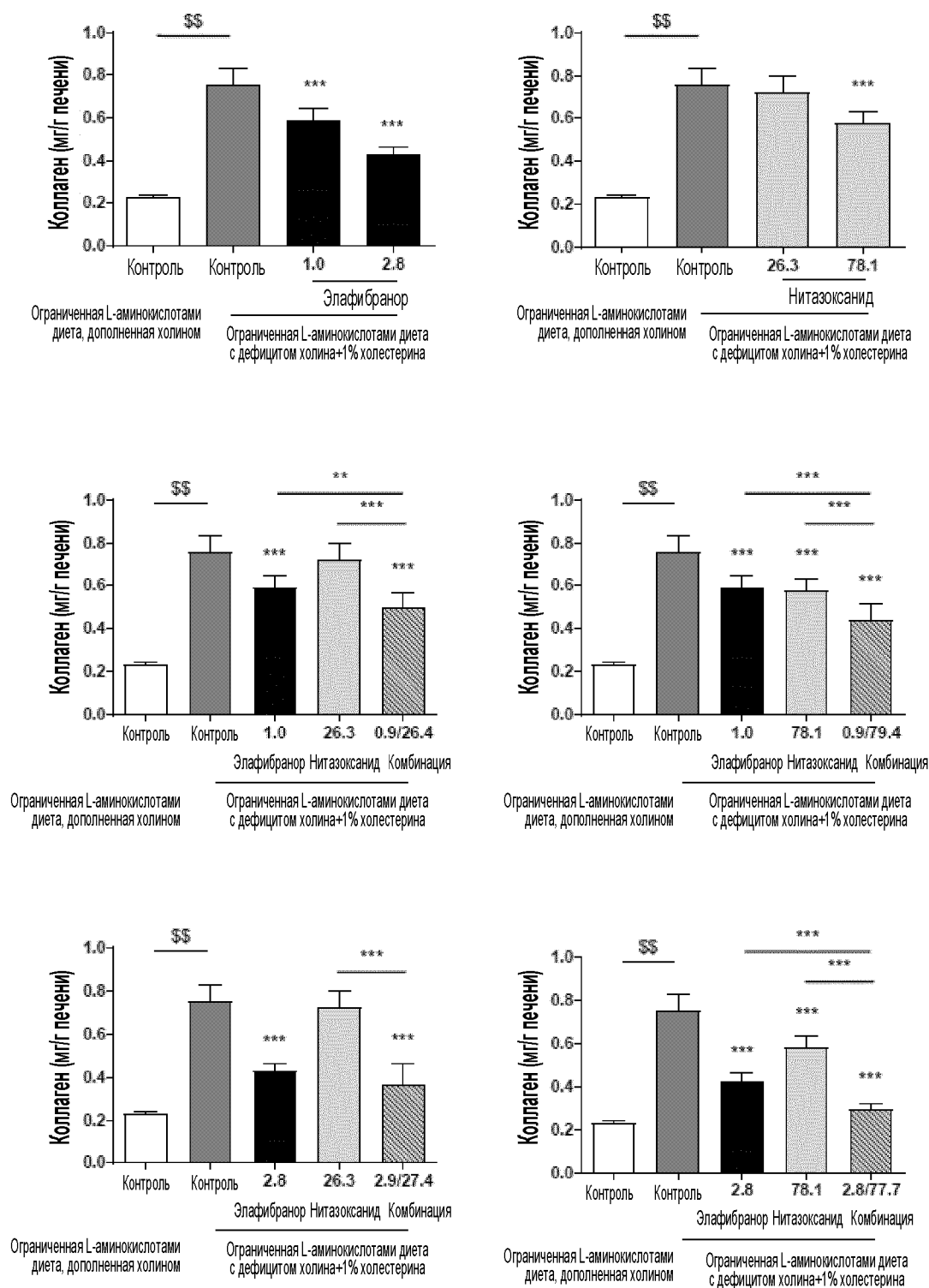


С



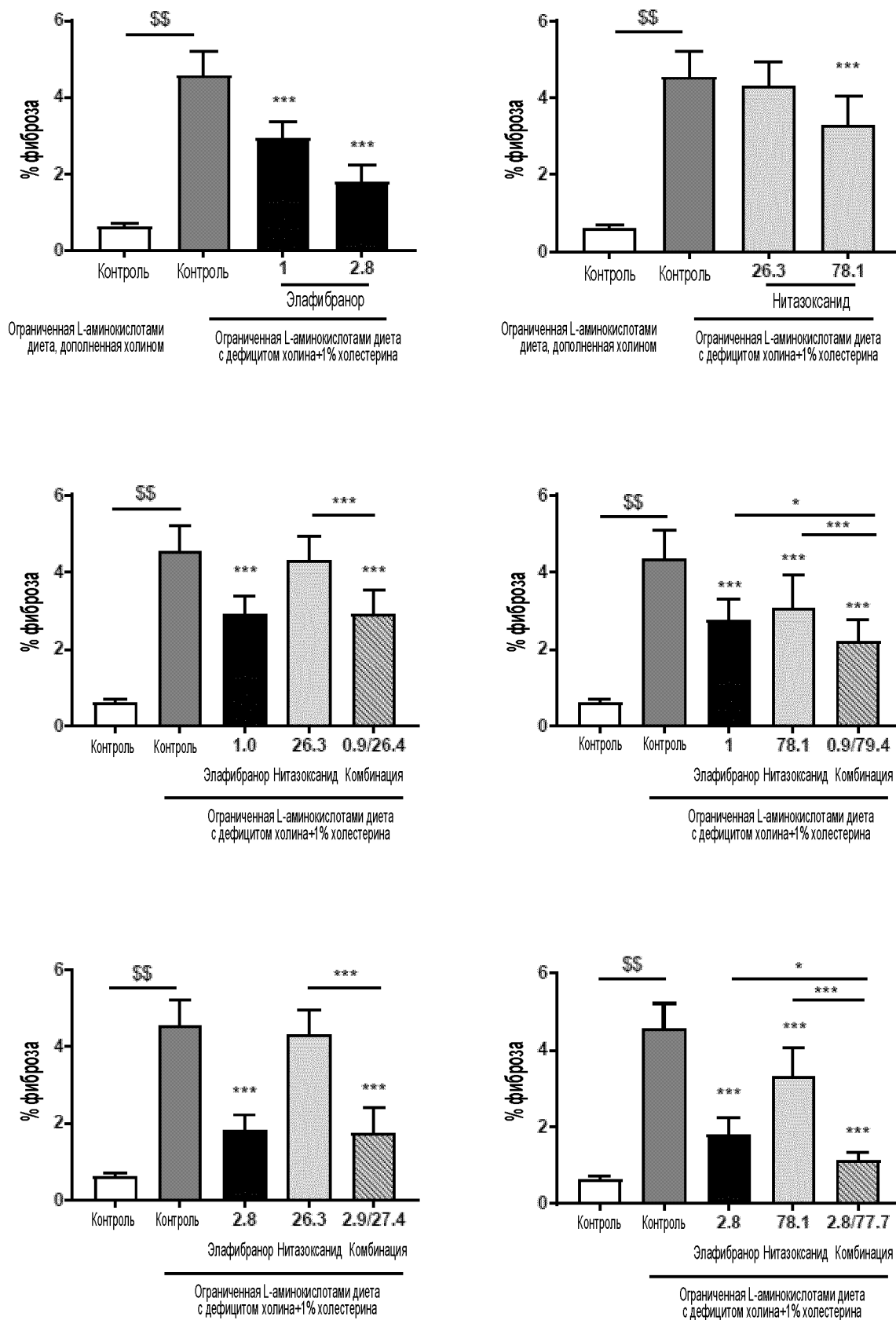
ФИГ. 4

Печеночный коллаген

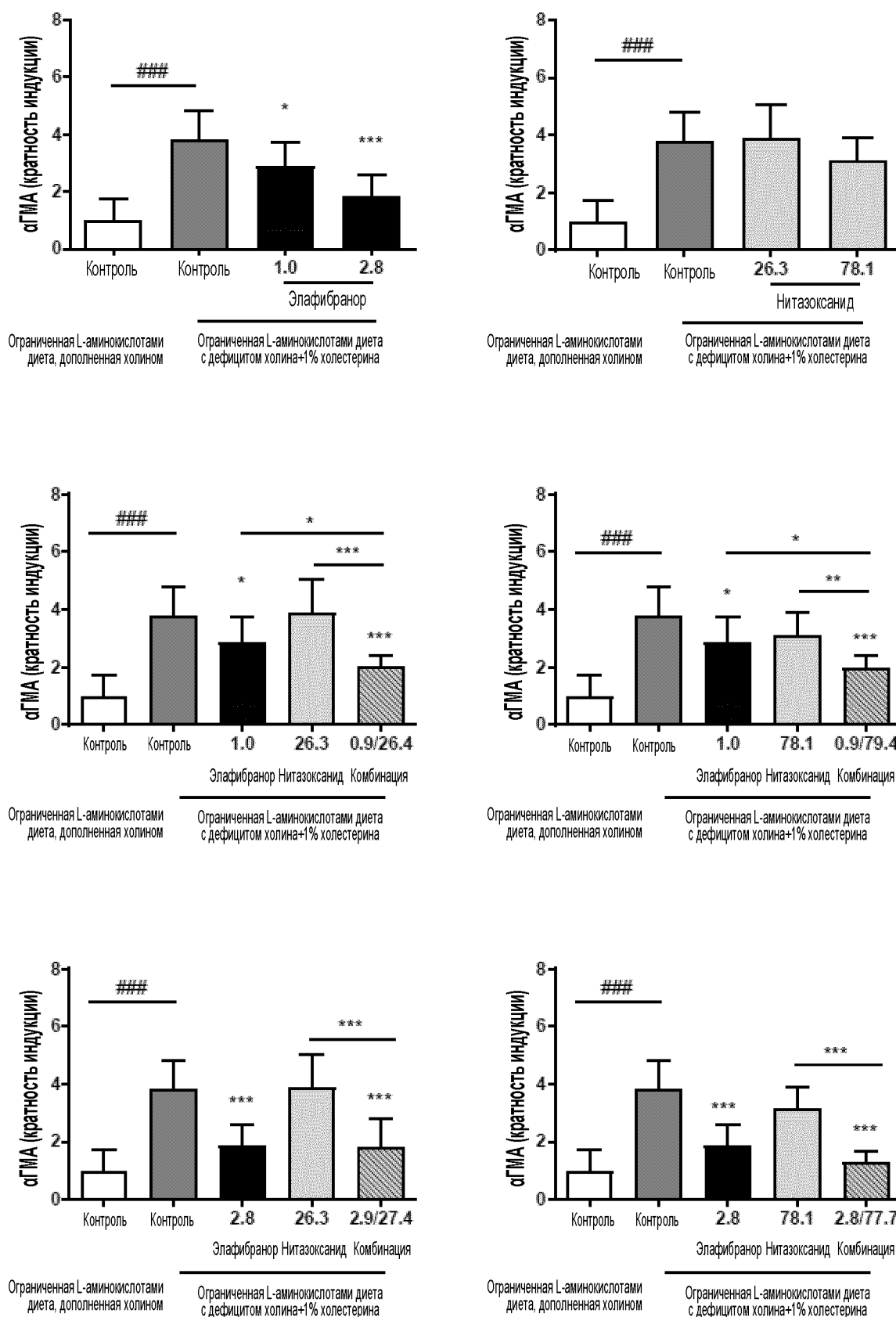


ФИГ. 5

Гистология

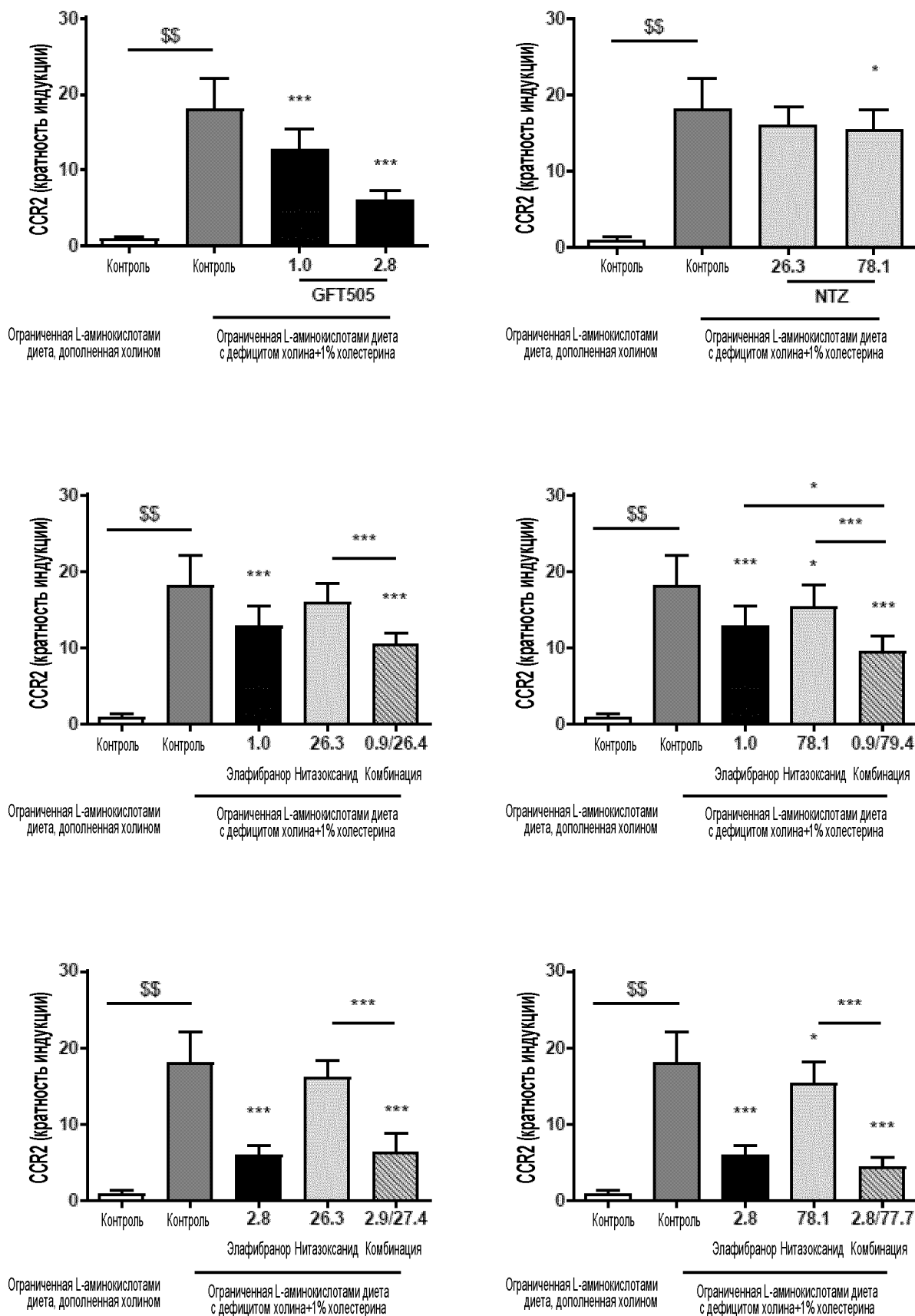


ФИГ. 6

Экспрессия гена α ГМА в печени

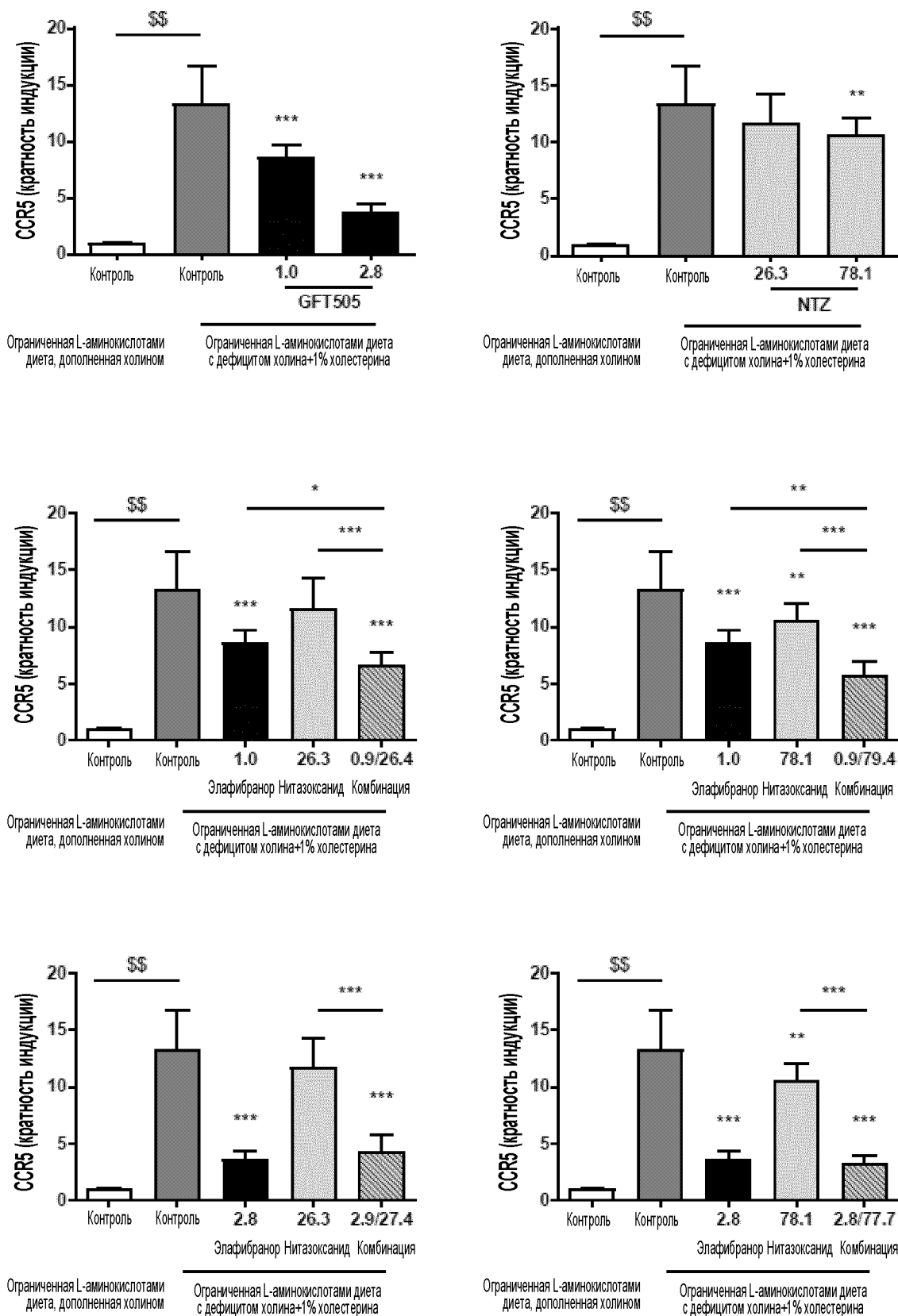
ФИГ. 7

Экспрессия гена CCR2 в печени



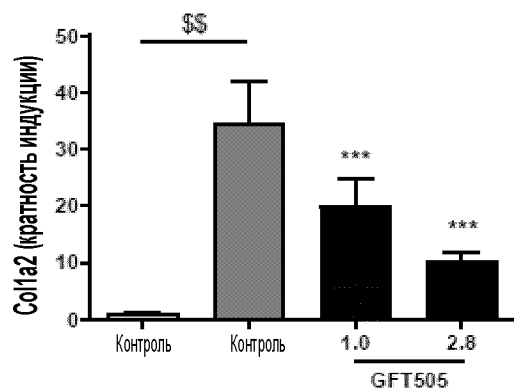
ФИГ. 8

Экспрессия гена CCR5 в печени



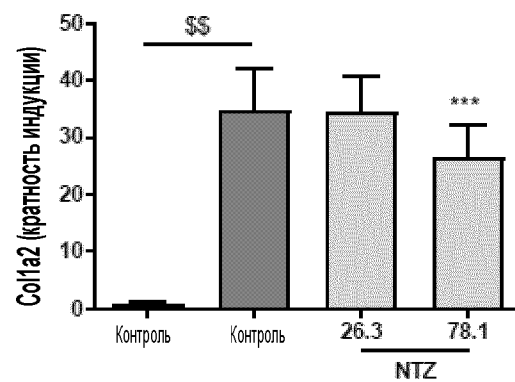
ФИГ. 9

Экспрессия гена Col1a2 в печени



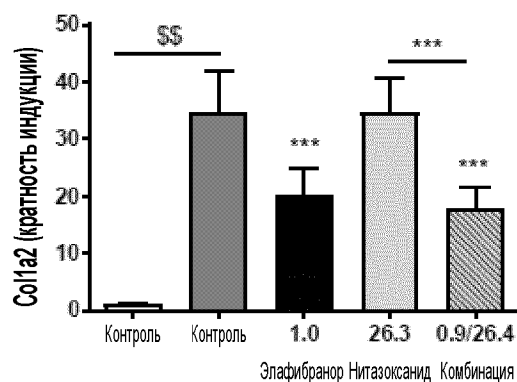
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



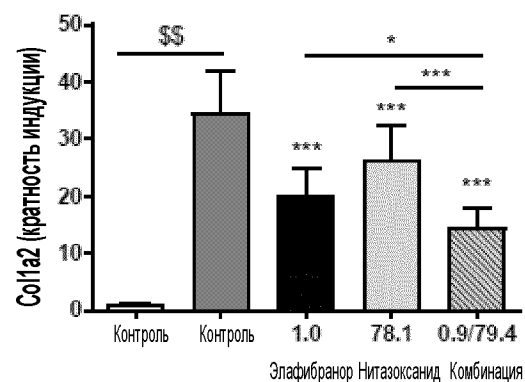
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



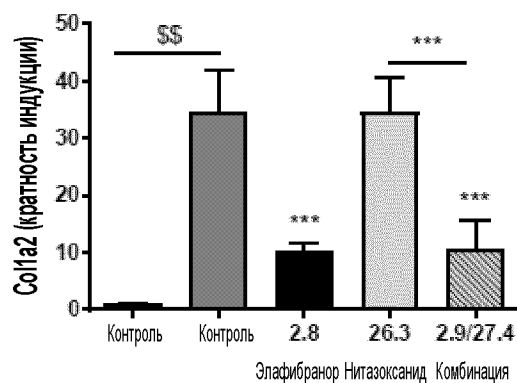
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



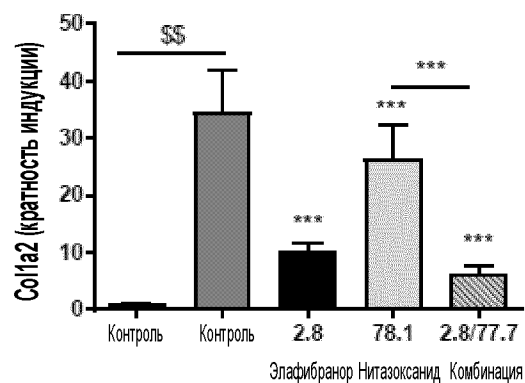
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина

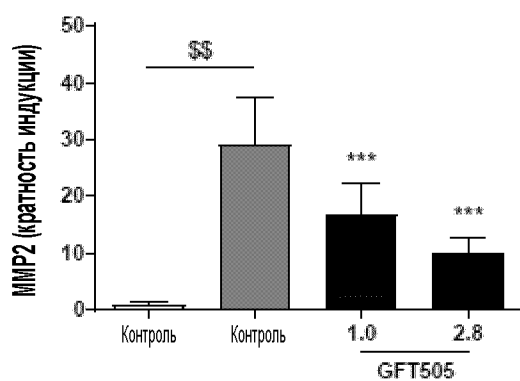


Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина

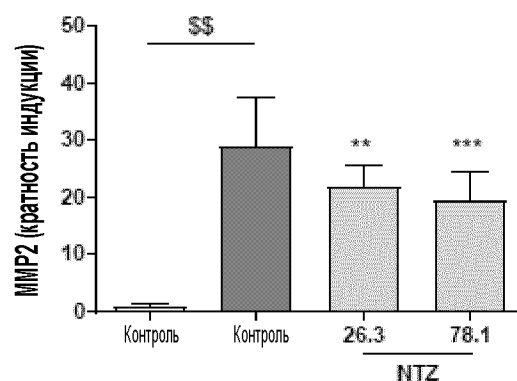
ФИГ. 10

Экспрессия гена MMP2 в печени



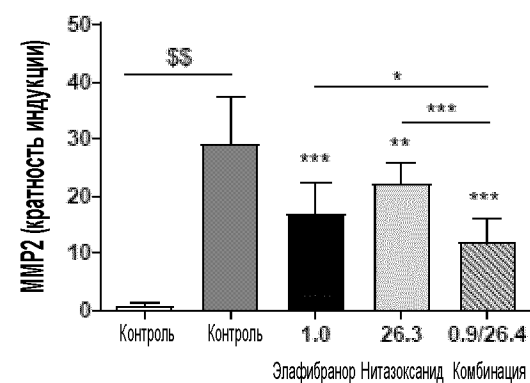
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



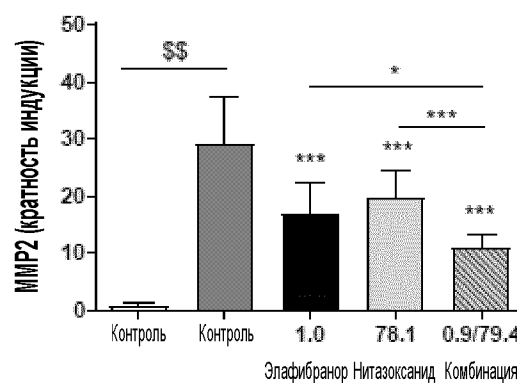
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



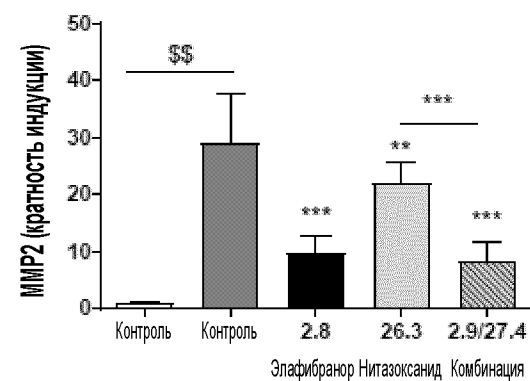
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



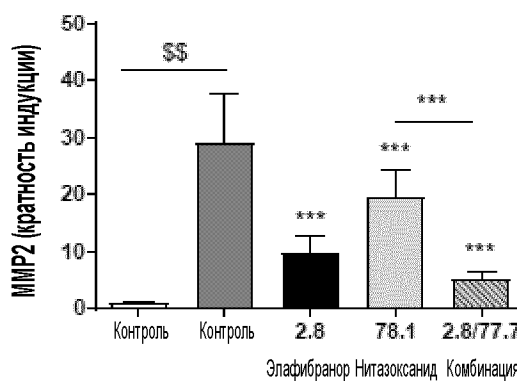
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина

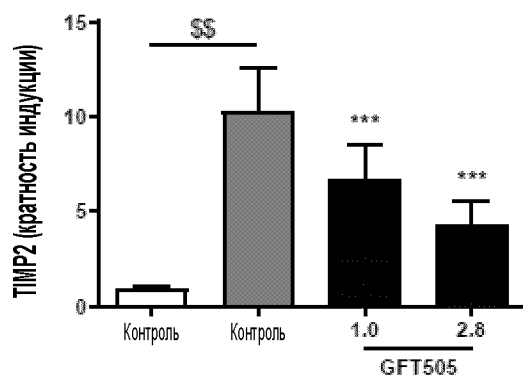


Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина

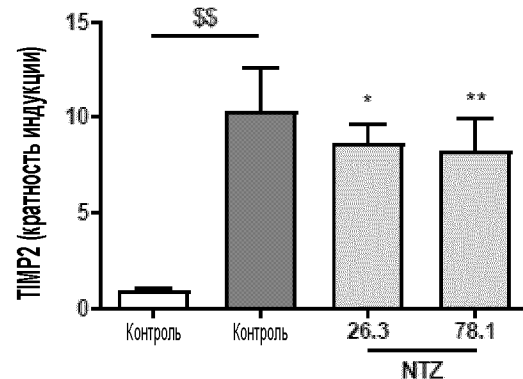
ФИГ. 11

Экспрессия гена TIMP2 в печени



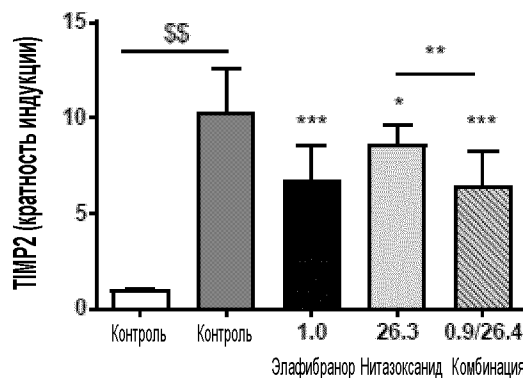
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



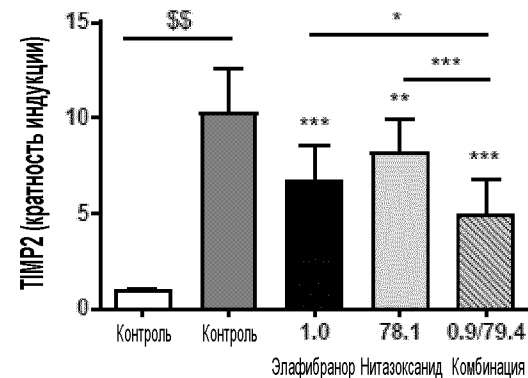
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



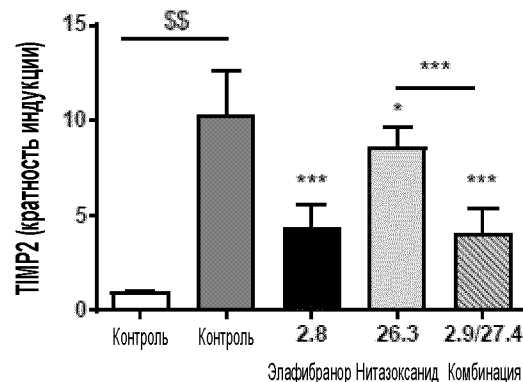
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



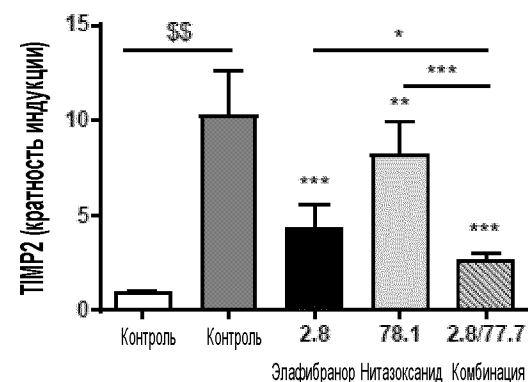
Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина



Ограниченная L-аминокислотами
диета, дополненная холином

Ограниченная L-аминокислотами диета
с дефицитом холина+1% холестерина

ФИГ. 12

Экспрессия гена TGFb1 в печени

