

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036342**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.29

(21) Номер заявки
201692433

(22) Дата подачи заявки
2015.06.12

(51) Int. Cl. *A61K 31/428* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПАНАГОНИСТА PPAR, А ИМЕННО 5-ХЛОП-1-[(6-БЕНЗОТИАЗОЛИЛ)СУЛЬФОНИЛ]-1Н-ИНДОЛ-2-БУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

(31) 14305894.9; 14305895.6; 14305896.4;
14305897.2; 14307187.6

(32) 2014.06.13; 2014.06.13; 2014.06.13;
2014.06.13; 2014.12.24

(33) EP

(43) 2017.05.31

(86) PCT/EP2015/063196

(87) WO 2015/189401 2015.12.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНВЕНТИВА (FR)

(72) Изобретатель:
**Константинова Ирина, Луккарини
Жан-Мишель, Жюньен Жан-Луи,
Брокуа Пьер (FR)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С., Хмара М.В., Дощечкина В.В.,
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)**

(56) A. BÉNARDEAU ET AL.: "Effects of the dual PPAR-[alpha]/[gamma] agonist aleglitazar on glycaemic control and organ protection in the Zucker diabetic fatty rat", DIABETES, OBESITY AND METABOLISM, vol. 15, no. 2, 3 October 2012 (2012-10-03), pages 164-174, XP055168875, ISSN: 1462-8902, DOI: 10.1111/dom.12006 abstract

BART STAELS ET AL.: "Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis", HEPATOLOGY, vol. 58, no. 6, 29 October 2013 (2013-10-29), pages 1941-1952, XP055182181, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/hep.26461 abstract
JP-A-2007191424
US-A1-2010286137

(57) Изобретение относится к применению панагониста PPAR, представляющего собой 5-хлор-1-[(6-бензотиазолил)сульфонил]-1н-индол-2-бутановую кислоту, или фармацевтической композиции, содержащей указанный панагонист, для лечения фибротического состояния.

B1

036342

**036342
B1**

Область техники

Изобретение относится к применению панагониста PPAR (рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом; от англ. peroxisome proliferator-activated receptors), представляющего собой 5-хлор-1-[(6-бензотиазол)сульфонил]-1H-индол-2-бутановую кислоту, или фармацевтической композиции, содержащей такой панагонист, для лечения фибротических состояний.

Предшествующий уровень техники

Фиброз печени является результатом сложных взаимодействий между различными типами клеток. Он характеризуется вовлечением воспалительных клеток в реакцию на хроническое повреждение и активацией звездчатых клеток печени (HSC; от англ. hepatic stellate cells), что приводит к аккумуляции внеклеточного матрикса. Стеатоз обычно существует совместно с воспалением печени и гепатоцеллюлярным повреждением. Повышенный оксидативный стресс является характерным фактором при всех хронических заболеваниях печени, приводящих к фиброзу, независимо от их этиологии. Поврежденные гепатоциты, HSC и инфильтрирующие воспалительные клетки являются основными источниками активных форм кислорода (ROS; от англ. reactive oxygen species). В свою очередь оксидативный стресс вызывает рекрутинг воспалительных клеток и активацию HSC. Поэтому в случае хронического повреждения печени возникает порочный круг из повреждения гепатоцитов, продукции ROS, активации HSC и рекрутинга воспалительных клеток, который усиливает фиброгенный ответ на повреждение.

Способы эффективного лечения фибротических заболеваний печени, таких как неалкогольный стеатоз печени (NAFLD; от англ. non-alcoholic fatty liver disease) и неалкогольный стеатогепатит (NASH; от англ. non-alcoholic steatohepatitis), пока остаются неудовлетворительными. Не существует общепринятого лечения пациентов с NASH, и некоторые терапевтические опции испытываются в клинических исследованиях (Vuppalanchi R. and Chalasani N., *Hepatology* 2009, 49(1): 306-317; Dowman J.K. et al., *Q.J. Med.* 2010, 103(2): 71-83). Эти исследования включают применение многих различных семейств химических соединений (фибраты, тиазолидиндионы, бигуаниды, статины, каннабиноиды) и различные терапевтические цели (ядерные рецепторы, ангиотензиновые рецепторы, рецепторы каннабиноидов, HMG-CoA-редуктаза). Недавно в исследованиях, в которых использовали тиазолидиндионы (росиглитазон и пиоглитазон), показано, что эти лекарственные средства могут улучшать состояние печени, однако лечение этими лекарственными средствами не лишено нежелательных эффектов, таких как более высокие риски застойной сердечной недостаточности и остеопороза, а также увеличение массы тела, оказывающее психологические эффекты на пациента (Dowman J.K. et al., см. выше; Shiri-Sverdlov R. et al., *J. Hepatol.* 2006, 44: 732-41; Neuschwander-Tetri et al., *Hepatology* 2003, 38:1008-1017). Клинические исследования, включавшие введение каннабиноидов, выявили проблему нейропсихиатрических нарушений (Vuppalanchi R. and Chalasani N., см. выше). В других способах лечения, разрабатываемых в настоящее время, для лечения NASH пытаются использовать антиоксиданты, но ни один из этих способов лечения еще не дал убедительных результатов (Nelson A. et al., *J. Clin. Gastroenterol.* 2009, 43: 990-994). Соединения-кандидаты для лечения болезней печени раскрыты в публикациях WO 2011/064350 и US 2013/108573. Однако все еще сохраняется потребность в соединениях, которые были бы пригодными для лечения болезней печени, в частности в соединениях, которые были бы нацелены на некоторые компоненты фибротического процесса, такие как стеатоз, воспаление и отложение коллагена, и были бы лишены побочных эффектов, наблюдаемых при использовании лекарственных средств, исследуемых в настоящее время.

Хроническая болезнь почек (СКД; от англ. chronic kidney disease), также известная под названием "хроническая почечная недостаточность" - это прогрессирующее снижение функции почек в течение нескольких месяцев или лет. Термин СКД имеет общее значение в данной области техники и используется для классификации многочисленных состояний, поражающих почки, вызывающих деструкцию почечной паренхимы и утрату функциональных нефронов или почечных клубочков. Также следует отметить, что СКД может быть обусловлена различными причинами, но конечным путем остается фиброз почек. Примеры этиологии СКД включают, но не ограничиваются этим, сердечно-сосудистые заболевания, гипертензию, диабет, гломерулонефрит, поликистозные заболевания почек и отторжение трансплантата почки. Почечный фиброз, характеризующийся гломерулосклерозом и тубулоинтерстициальным фиброзом, является распространенным проявлением большого многообразия хронических болезней почек. Патогенез почечного фиброза является, по существу, монотонным процессом, который характеризуется избыточным накоплением и отложением компонентов внеклеточного матрикса (ECM; от англ. extracellular matrix). Фиброз почек - это прогрессирующий процесс, который в конечном итоге приводит к терминальной почечной недостаточности - тяжелому расстройству, которое требует диализа или трансплантации почек. Тем не менее, не существует специфического лечения, для которого было бы определено показано, что оно замедляет прогрессирование хронической болезни почек. Повреждение почек связано с выделением цитокинов/факторов роста, таких как TGF- β (трансформирующий фактор роста бета; от англ. transforming growth factor beta), эпидермальный фактор роста (EGF; от англ. epidermal growth factor) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF; от англ. platelet derived growth factor), поврежденными или инфильтрирующими клетками. Повышение продукции TGF- β - один из важнейших механизмов, участвующих в патогенезе почечного фиброгенеза. TGF- β 1 стимулирует активацию клеток-фибробластов и индуцирует экс-

прессию матрикса через его взаимодействие с рецепторами TGF- β , которые преимущественно состоят из двух семейств белков-рецепторов типа I (T β RI) и типа II (T β RII). TGF- β 1 связывается с T β RII, что приводит к рекрутингу T β RI с образованием гетеромерного комплекса TGF- β -рецептор. Комплекс фосфорилирует и активирует Smad2 и Smad3 - два основных типа белков Smad (от англ. Similar to Mothers Against Decapentaplegic), которые опосредуют профибротические явления. Другие сигнальные пути, такие как путь через внеклеточно регулируемую киназу 1/2 (ERK1/2; от англ. extracellular regulated kinase 1/2), также могут быть активированы в ответ на активацию рецепторов TGF- β . Активированная ERK1/2 участвует в апоптозе клеток почечных канальцев в обструктивной почке. Поскольку считается, что активация сигнального пути через TGF- β является основным механизмом, который непосредственно стимулирует активацию фибробластов и прогрессирование фиброза, терапевтическое вмешательство в этот путь может быть признано стратегией для прекращения развития или профилактики фиброза почек. Соединения-кандидаты для лечения СКД раскрыты в публикациях WO 2012/159107 и WO 2014/013005. Однако все еще сохраняется потребность в соединениях, пригодных для лечения СКД.

Фибротическое ремоделирование легких возникает при таких болезненных состояниях легких как острый респираторный дистресс-синдром, хроническая обструктивная болезнь легких и астма. Легочный фиброз характеризуется избыточным отложением внеклеточного матрикса в интерстиции, что приводит к респираторной недостаточности. Легочный фиброз может быть вызван многими различными состояниями, включающими саркоидоз, гиперчувствительный пневмонит, коллагеноз сосудов и воздействие ингалянтов. У значительного числа пациентов невозможно обнаружить первопричину легочного фиброза. Эти состояния неизвестной этиологии были названы идиопатическими интерстициальными пневмониями. Наиболее распространенной формой идиопатической интерстициальной пневмонии является идиопатический легочный фиброз (IPF; от англ. idiopathic pulmonary fibrosis). Начальной гистопатологической картиной при IPF является картина обычной интерстициальной пневмонии с временной гетерогенностью чередующихся зон интерстициального фиброза, фибробластических фокусов (то есть зон более свежего фиброза), воспаления, ячеистых изменений (то есть зон более старого фиброза) и нормальной легочной архитектуры (то есть ткани без признаков фиброза). Соединения-кандидаты для лечения IPF раскрыты в WO 2004/103296. Соединения-кандидаты для лечения фибротических заболеваний легких раскрыты в WO 2009/149188. Недавно проведенные исследования, включавшие тиазолидиндионы, такие как росглитазон, показали, что эти лекарственные средства могут улучшать состояние при легочном фиброзе, но лечение этими лекарственными средствами не лишено нежелательных эффектов, таких как более высокие риски застойной сердечной недостаточности (Kung J. et al., Expert Opin. Drug Saf. 2012, 11(4):565-579). Пирфенидон (5-метил-1-фенил-2-(1H)-пиридон) обладает антифибротическими свойствами и одобрен в Европе и Японии для лечения IPF. Однако все еще сохраняется потребность в альтернативных соединениях, которые были бы пригодными для лечения фибротических заболеваний легких.

Фибротические заболевания характеризуются аномальным и избыточным отложением коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ) в различных тканях. Хотя их этиология очень различна, типичным для фибротических заболеваний является присутствие ЕСМ-продуцирующих фибробластов, демонстрирующих активированный фенотип в пораженных тканях. Активация фибробластов характеризуется заметным возрастанием транскрипционной активности генов, кодирующих коллагены типа I и типа III и фибронектин, инициацией экспрессии гладкомышечного актина-альфа (α -SMA; от англ. alpha-smooth muscle actin) и снижением деградационной активности в отношении ЕСМ. Наиболее частым системным фибротическим заболеванием является системный фиброз, который является редким хроническим заболеванием с неизвестной причиной. Это клинически гетерогенное системное расстройство, при котором поражается соединительная ткань кожи, внутренних органов и стенок кровеносных сосудов. Оно характеризуется нарушениями микроциркуляторного русла, расстройствами иммунной системы и массивным отложением коллагена и других веществ матрикса в соединительной ткани. Известно, что базовые функции различных типов клеток (эндотелиальных клеток, Т-лимфоцитов, моноцитов, фибробластов, тучных клеток), а также продукция и эффекты цитокинов, факторов роста и молекул адгезии участвуют в развитии этого заболевания. Системный фиброз часто называют склеродермией. Спектр склеродерматозных заболеваний включает широкое разнообразие клинических форм, таких как очаговая склеродермия (пятнистая, линейная и генерализованная), псевдосклеродермия и перекрывающиеся синдромы со сходными кожными и гистопатологическими проявлениями. Кроме того, сложная патофизиология системного фиброза, включающая генетические факторы, факторы окружающей среды, функции сосудистой и иммунной систем, а также фибробласты и вещества матрикса, и сложность поражений внутренних органов приводят к тому, что склеродерматозные заболевания часто изучают как аутоиммунные болезни или заболевания соединительной ткани. Поэтому системный фиброз всегда был проблемой для клиницистов при выборе диагностических процедур и схем лечения. Клиническая диагностика системного фиброза часто требует внимания представителей нескольких дисциплин (например, дерматологов, ревматологов, пульмонологов, нефрологов и гастроэнтерологов) и может включать инвазивные процедуры, такие как биопсия фибротической ткани и/или кожи, для подтверждения диагноза.

Соединения-кандидаты для лечения системного фиброза раскрыты в публикациях US 2013/0287794 и US 2014/0038956. Однако сохраняется потребность в альтернативных соединениях, пригодных для лечения системного фиброза.

Рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR) - это группа ядерных рецепторных белков, которые функционируют как факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов. PPAR играют важные роли в регуляции дифференциации, развития и метаболизма (углеводного, липидного, белкового) клеток. Идентифицированы три подтипа PPAR:

PPAR α , которые преимущественно экспрессируются в печени, почках, сердце, мышцах, жировой ткани и легких;

PPAR γ , которые экспрессируются практически во всех тканях;

PPAR δ , которые встречаются в различных тканях/клетках, в частности в сердечно-сосудистой, мочевыводящей, дыхательной, пищеварительной и скелетно-мышечной системах.

Агонистами PPAR являются лекарственные средства, которые действуют на PPAR. Их используют для лечения симптомов метаболических болезней, преимущественно для снижения уровней триглицеридов и сахара в крови.

Агонисты PPAR α , по существу, относятся к классу фибратов (например, фенофибрат). Агонисты PPAR γ , по существу, относятся к тиазолидиндионам (например, росиглитазон и пиоглитазон). Агонисты PPAR δ включают GW501516 - соединение-кандидат, применение которого в конечном итоге прекратили в связи с проблемами с безопасностью.

Экспрессия рецепторов PPAR модифицируется при фибротических заболеваниях. Например, снижение экспрессии PPAR γ воспроизводимо описывают в биоптатах кожи и в трансплантированных фибробластах кожи, полученных от пациентов с системной склеродермией (Lakota et al., *Arthritis Res. Ther.* 2012 May 1; 14(3)). Сниженная экспрессия PPAR γ также описана в фибробластах легких у пациентов со склеродермией (Bogatkevich et al., *Pulm. Med.* Vol. 2012; 2012). Агонисты PPAR γ росиглитазон и пиоглитазон защищают грызунов от индуцированного блеомицином фиброза кожи и легких *in vivo* и предотвращают активацию профибротических путей и процессов *in vitro* в клеточных линиях фибробластов и в первичных фибробластах (Aoki et al., *Respiration*, 2009; 77(3):311-9; Samah et al., *Eur. J. Pharmacol.* 2012 Aug 15; 689(1-3)). Рецепторы PPAR α также модулируют профибротический ответ на различные стимулы. В легких фенофибрат - специфический агонист PPAR α - предотвращал фиброз, индуцированный блеомицином (Samah et al., 2012, см. выше). Кроме того, показано, что агонист PPAR γ GW0742 снижает воспаление легких, вызванное инстилляцией блеомицина у мышей (Galuppo et al., *Jnt. J. Immunopathol Pharmacol*, 2010 Oct-Dec; 23(4): 1033-46).

Сущность изобретения

В настоящее время обнаружено, что панагонисты PPAR, то есть соединения, которые активируют все три рецептора PPAR (PPAR α , PPAR γ и PPAR δ), оказывают благоприятные эффекты при лечении различных фибротических состояний. Поэтому в настоящем изобретении предложено применение панагониста PPAR для лечения фибротического состояния. В настоящем изобретении также предложено применение фармацевтической композиции, содержащей панагонист PPAR, для лечения фибротического состояния.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фибротическим состоянием является состояние, поражающее любой орган, в котором может развиваться фиброз, такой как сердце, легкие, печень, почка, желудочно-кишечный тракт, кожа.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние выбрано из фиброза печени, стеатоза печени, неалкогольного стеатогепатита, хронической болезни почек, фибротического заболевания легких, например идиопатического легочного фиброза, и системной склеродермии.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения, который может быть объединен с предыдущими, панагонист PPAR предназначен для перорального введения.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая панагонист PPAR, предназначена для перорального, парентерального, местного, ингаляционного или интраназального введения.

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения панагонистом PPAR является 5-хлор-1-[(6-бензотиазол)сульфонил]-1H-индол-2-бутановая кислота.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует уровни триглицеридов в плазме у подвергнутых воздействию CCl₄ мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 2 демонстрирует отложение коллагена у подвергнутых воздействию CCl₄ мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 3 демонстрирует экспрессию TGF β -1 у подвергнутых воздействию CCl₄ мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 4 демонстрирует экспрессию Col1a у подвергнутых воздействию CCl₄ мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 5 демонстрирует экспрессию α -SMA у подвергнутых воздействию CCl_4 мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 6 демонстрирует экспрессию MCP-1 (моноцитарного хемотаксического фактора 1; от англ. monocyte chemoattractant protein 1) у подвергнутых воздействию CCl_4 мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 7 демонстрирует экспрессию фибронектина у подвергнутых воздействию CCl_4 мышей, обработанных носителем, соединением А и росиглитазоном.

Пояснения к фиг. с 1 по 7: в группе животных, получавших масло, столбики представляют (слева направо): носитель, соединение А (100 мг/кг) и росиглитазон; в группе с CCl_4 столбики представляют (слева направо): носитель, соединение А (30 мг/кг), соединение А (100 мг/кг) и росиглитазон.

Фиг. 8 демонстрирует уровни мочевины в сыворотке у подвергнутых воздействию антител к базальной мембране почечных клубочков (GBM; от англ.: glomerular basement membrane) мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 9 демонстрирует объемы мочи у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 10 демонстрирует уровни альбумина в моче у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 11 демонстрирует уровни остеопонтина у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 12 демонстрирует уровни MCP-1 у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 13 демонстрирует экспрессию TGF β R1 у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 14 демонстрирует экспрессию Col1a у подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 15 демонстрирует экспрессию Col3a у подвергнутых воздействию анти-GBM мышей, получавших лечение носителем, каптоприлом, росиглитазоном, пиоглитазоном и соединением А.

Фиг. 16 демонстрирует количество патологических клубочков у подвергнутых воздействию анти-GBM мышей, получавших лечение носителем и соединением А.

Пояснения к фиг. 8-15: столбики представляют (слева направо): контрольных мышей; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение каптоприлом; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение росиглитазоном; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение пиоглитазоном; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение соединением А (30 мг/кг), и подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение соединением А (100 мг/кг). Пояснения к фиг. 16: столбики представляют (слева направо) контрольных мышей; подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение носителем, и подвергнутых воздействию антител к GBM мышей, получавших лечение соединением А (100 мг/кг).

Фиг. 17 демонстрирует отложение коллагена у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 18 демонстрирует уровни TIMP-1 (тканевого ингибитора металлопротеиназ-1; от англ. tissue inhibitor of metalloproteinases) у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 19 демонстрирует уровни MCP-1 у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 20 демонстрирует уровни остеопонтина у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 21 демонстрирует экспрессию TGF β R1 у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 22 демонстрирует экспрессию Col1a у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 23 демонстрирует экспрессию Col3a у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 24 демонстрирует экспрессию TIMP-1 у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 25 демонстрирует экспрессию MCP-1 у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 26 демонстрирует экспрессию остеопонтина у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 29 демонстрирует экспрессию фибронектина у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Пояснения к фиг. с 17 по 27: в группе с солевым раствором столбики представляют (слева направо): носитель, соединение А (100 мг/кг) и росиглитазон; в группе с блеомицином столбики представляют (слева направо): носитель, соединение А (30 мг/кг), соединение А (100 мг/кг) и росиглитазон.

Фиг. 28 демонстрирует толщину дермы у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 28 демонстрирует толщину дермы у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 29 демонстрирует содержание гидроксипролина у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Фиг. 30 демонстрирует содержание коллагена у подвергнутых воздействию блеомицина мышей, получавших лечение носителем, соединением А и росиглитазоном.

Пояснения к фиг. 28-30: Bleo - блеомицин; IVA30 - соединение А (30 мг/кг); IVA100 - соединение А (100 мг/кг); Ros - росиглитазон.

Фиг. 31 демонстрирует активацию рецепторов PPAR α , γ и δ человека соединением А как функцию концентрации этого соединения.

Фиг. 32 демонстрирует активацию рецепторов PPAR α , γ и δ мыши соединением А как функцию концентрации этого соединения.

Фиг. 33 демонстрирует эффект соединения А, фенофибровой кислоты и росиглитазона на индуцированную тромбоцитарным фактором роста (PDGF; от англ. platelet-derived growth factor) пролиферацию в первичных фибробластах легкого человека.

Фиг. 34 демонстрирует эффект соединения А, фенофибровой кислоты и росиглитазона на индуцированную PDGF пролиферацию в первичных фибробластах дермы человека.

Фиг. 35 демонстрирует эффект соединения А, фенофибровой кислоты и росиглитазона на индуцированный TGF β переход фибробластов в миофибробласты (FMT; от англ. fibroblasts to myofibroblasts transition) в первичных фибробластах легкого человека.

Фиг. 36 демонстрирует эффект соединения А, фенофибровой кислоты и росиглитазона на индуцированный TGF β FMT в первичных фибробластах дермы человека.

Пояснения к фиг. 33-36: Rosi - росиглитазон; Feno - фенофибровая кислота.

На фиг. с 1 по 36 соединением А является 5-хлор-1-[(6-бензотиазолил)сульфонил]-1H-индол-2-бутановая кислота.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Хроническое повреждение печени, вызванное жирами, алкоголем, вирусом или химическим веществом, может индуцировать активацию звездчатых клеток печени для секреции большого количества внеклеточного матрикса, например коллагена, что может привести к фиброзу печени вследствие избыточного отложения внеклеточного матрикса.

Хроническая болезнь почек (СКД) является результатом различных повреждений почек, поражающих примерно 10% всего населения. Это прогрессивный процесс, характеризующийся интерстициальным фиброзом. Первичной целью лечения пациентов с СКД является профилактика или, по меньшей мере, замедление прогрессирования СКД.

Легочный фиброз, также называемый идиопатическим легочным фиброзом (IPF), интерстициальным диффузным легочным фиброзом, воспалительным легочным фиброзом или фиброзным альвеолитом, является воспалительным нарушением функции легких и гетерогенной группой состояний, характеризующихся аномальным образованием фиброзной ткани между альвеолами, вызванным альвеолитом, включающим воспалительную клеточную инфильтрацию в альвеолярные септы с результирующим фиброзом. Эффекты IPF являются хроническими, прогрессирующими и часто фатальными. Большое количество исследований, посвященных легочному фиброзу, показало, что постоянная и повышенная экспрессия некоторых цитокинов в легких приводит к рекрутингу воспалительных клеток и аккумуляции компонентов внеклеточного матрикса с последующим ремоделированием архитектуры легкого. В частности, продемонстрировано, что провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей альфа (TNF- α ; от англ. tumor necrosis factor alpha) и интерлейкин IL-1 β , играют важные роли в формировании пневмонита и легочного фиброза. Кроме того, профибротические цитокины, такие как трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α ; от англ. transforming growth factor alpha) и фактор роста соединительной ткани (CTGF; от англ. connective tissue growth factor), также играют критические роли в патогенезе легочного фиброза.

Склеродермия - это болезнь, которая вызывает утолщение кожи и дисфункцию органов различной степени тяжести, являющиеся результатом васкулопатии мелких сосудов и иммуноопосредованного фиброза. Клинические проявления этой болезни являются очень гетерогенными и зависят от наличия и степени поражения внутренних органов. Пациенты могут иметь спектр проявлений болезни, варьирующихся от локализованного фиброза кожи (локализованная склеродермия) до системного нарушения с поражением кожи и внутренних органов. Локализованная склеродермия включает различные формы склероза кожи без поражения внутренних органов. Эти формы склеродермии могут быть обезображи-

вающими, но лишь очень редко для контроля активности болезни требуется системная терапия. Системный склероз далее разделяют на две разновидности болезни в зависимости от степени поражения кожи и органов. Наличие диффузного системного склероза означает наличие распространенного склероза кожи на проксимальных участках конечностей, туловище и лице. Пациенты с ограниченным системным склерозом имеют фиброз, ограниченный кистями рук, предплечьями, ступнями, голенями и лицом. Как диффузный, так и ограниченный системный склероз связаны с поражением внутренних органов; однако пациенты с диффузным системным склерозом имеют больший риск клинически значимой дисфункции основных органов. Некоторых пациентов с ограниченным системным склерозом можно дополнительно классифицировать как имеющих CREST-синдром (от англ. Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, cutaneous Teleangiectasias) с сопутствующими кальцинозом, феноменом Рейно, дискинезией пищевода, склеродактилией и кожными телеангиоэктазиями. Склеродермия без склероза - редкое расстройство, при котором у пациентов развиваются сосудистые и фибротические повреждения внутренних органов в отсутствие склероза кожи. Патофизиология системного склероза включает повреждение сосудов и активацию фибробластов, а также гиперпродукцию коллагена и других внеклеточных белков в различных тканях. Склеродермия характеризуется активацией иммунной системы, дисфункцией эндотелия и повышенной активностью фибробластов. Точные провоцирующие факторы, приводящие к развитию системного склероза, в настоящее время неизвестны. Несколько цитокинов, включая интерлейкин-4 и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), участвуют в активации фибробластов у пациентов со склеродермией. Эти цитокины выделяются из активированных иммунных клеток, фибробластов и эндотелиальных клеток. Активированные фибробласты вырабатывают структурно нормальный коллаген и другие белки внеклеточного матрикса в коже и различных внутренних органах.

Настоящее изобретение основано на обнаруженном факте, состоящем в том, что панагонисты PPAR оказывают положительные эффекты при лечении фибротических состояний, таких как состояния, указанные выше. В контексте настоящего изобретения термин "панагонист PPAR" относится к соединению, которое значимо активирует все рецепторы - PPAR α , PPAR γ и PPAR δ , то есть к соединению, которое можно по отдельности признать агонистом PPAR α , агонистом PPAR γ и агонистом PPAR δ на основании соответствующих значений EC₅₀. Согласно настоящему изобретению значимая активация рецепторов PPAR α , PPAR γ и PPAR δ достигнута, если значение EC₅₀ для каждого рецептора меньше или равно 10⁻⁶ М. Значения EC₅₀ для трех подтипов рецепторов предпочтительно различаются по величине менее чем на 2 порядка (то есть отношение EC₅₀ для двух подтипов рецепторов либо меньше 100, либо больше 0,01). В варианте осуществления настоящего изобретения панагонист PPAR не является безафифратом.

Поэтому в одном из аспектов настоящего изобретения предложено применение панагониста PPAR для лечения фибротического состояния.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние является состоянием, поражающим любой орган, в котором может развиваться фиброз, такой как сердце, легкие, печень, почка, желудочно-кишечный тракт, кожа.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние выбрано из фиброза печени, стеатоза печени, неалкогольного стеатогепатита, хронической болезни почек, фибротического заболевания легких, системной склеродермии.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние является заболеванием печени, предпочтительно фиброзом печени, стеатозом печени или неалкогольным стеатогепатитом.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние является хронической болезнью почек. Болезнь, в частности, выбрана из нефропатии (например, мембранозной нефропатии, диабетической нефропатии и гипертонической нефропатии), гломерулонефрита (например, мембранозного гломерулонефрита и мембранопролиферативного гломерулонефрита, такого как быстро прогрессирующий гломерулонефрит), интерстициального нефрита, волчаночного нефрита, идиопатического нефротического синдрома (например, нефротического синдрома с минимальными изменениями и фокального сегментарного гломерулосклероза), обструктивной уропатии, поликистозной болезни почек (например, аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек и аутосомно-рецессивной поликистозной болезни почек) и отторжения трансплантата почки (например, острого и хронического отторжения трансплантата почки).

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние является фибротическим заболеванием легких, предпочтительно идиопатическим легочным фиброзом.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения фибротическое состояние является фиброзом кожи, таким как системная склеродермия.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения, который может быть объединен с любым из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения, панагонист PPAR предназначен для перорального введения.

Панагонист PPAR может быть включен в фармацевтическую композицию для введения.

Поэтому другой аспект настоящего изобретения относится к применению фармацевтической ком-

позиции, включающей панагонист PPAR совместно с фармацевтически приемлемым наполнителем, для лечения фибротического состояния, указанного выше в различных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция содержит терапевтически эффективное количество панагониста PPAR. В контексте настоящего изобретения термин "терапевтически эффективное количество" означает количество панагониста PPAR, достаточное для обеспечения желаемого эффекта. В конечном итоге лечащий врач выбирает соответствующее количество и схему дозирования.

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение панагониста PPAR для получения медикамента для лечения фибротического состояния, указанного выше в различных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения.

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения фибротического состояния, указанного выше в различных вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества панагониста PPAR. Субъектом в характерном случае является млекопитающее, предпочтительно человек. Термин "терапевтически эффективное количество" имеет такое же значение, как указано выше.

Панагонист PPAR обычно вводят в виде композиции совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "наполнитель" в контексте настоящего изобретения используют для обозначения любого ингредиента, отличающегося от панагониста PPAR. Выбор наполнителя (или наполнителей) в большой степени будет зависеть от таких факторов как конкретный способ введения, эффект наполнителя на растворимость, стабильность и природа лекарственной формы.

Фармацевтические композиции, пригодные для доставки панагониста PPAR, и способы их получения будут очевидными для специалистов в данной области техники. Такие композиции и способы их получения можно найти, например, в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995), содержание которой полностью включено в данную публикацию посредством ссылки.

Пероральное введение

Панагонист PPAR можно ввести перорально. Пероральное введение может включать проглатывание, при котором соединение попадает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, при которых соединение проникает в кровоток непосредственно из ротовой полости. Композиции, пригодные для перорального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие множество частиц или наночастицы, жидкости или порошки; таблетки для рассасывания (в том числе заполненные жидкостью); жевательные резинки; гели; быстро диспергируемые лекарственные формы; пленки; овулы; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

Жидкие композиции включают суспензии, растворы, сиропы и эликсиры. Такие композиции можно использовать как наполнители для мягких или твердых капсул (изготовленных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), и в характерном случае они содержат носитель, например воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло, и одно или более эмульгирующих средств и/или суспендирующих средств. Жидкие композиции можно также приготовить посредством растворения твердых веществ, например из саше.

В случае таблетированных или капсулированных лекарственных форм, в зависимости от дозы, лекарственное средство может составлять от 1 до 80 мас.% лекарственной формы, в более характерном случае - от 5 до 60 мас.% лекарственной формы. Кроме лекарственного средства таблетки обычно содержат дезинтегрирующее средство. Примеры дезинтегрирующих средств включают натрия крахмала гликолят, натрий карбоксиметилцеллюлозу, натрий кросскармелозу, кросповидон, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, замещенную низшими алкильными группами, крахмал, предварительно желатинизированный крахмал и альгинат натрия. В характерном случае дезинтегрирующее средство будет составлять от 1 до 25 мас.%, предпочтительно от 5 до 20 мас.%, лекарственной формы.

Связующие обычно используют для придания когезивных свойств таблетированной композиции. Подходящие связующие включают микрокристаллическую целлюлозу, желатин, сахара, полиэтиленгликоль, натуральные и синтетические камеди, поливинилпирролидон, предварительно желатинизированный крахмал, гидроксипропилцеллюлозу и гидроксипропилметилцеллюлозу. Таблетки могут также содержать разбавители, например лактозу (моногидрат, моногидрат, высушенный распылением, безводную лактозу и т.п.), маннитол, ксилитол, декстрозу, сахарозу, сорбитол, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал и двухосновного фосфата кальция дигидрат.

Таблетки или капсулы могут также необязательно содержать поверхностно-активные средства, такие как натрия лаурилсульфат и полисорбат 80, и вещества, обеспечивающие скольжение, такие как диоксид кремния и тальк. Если они присутствуют, то поверхностно-активные средства могут составлять от 0,2 до 5 мас.% таблетки, а вещества, обеспечивающие скольжение, могут составлять от 0,2 до 1 мас.% таблетки.

Таблетки также обычно содержат смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеарат каль-

ция, стеарат цинка, стеарилфумарат натрия и смеси стеарата магния с лаурилсульфатом натрия. Смазывающие средства обычно составляют от 0,25 до 10 мас.%, предпочтительно от 0,5 до 3 мас.%, таблетки.

Другими возможными ингредиентами являются антиоксиданты, красители, вкусовые добавки, консерванты и агенты, маскирующие вкус.

Характерная таблетка содержит до примерно 80 мас.% лекарственного средства, от примерно 10 до примерно 90 мас.% связующего, от примерно 0 до примерно 85 мас.% разбавителя, от примерно 2 до примерно 10 мас.% дезинтегрирующего средства и от примерно 0,25 до примерно 10 мас.% смазывающего средства.

Смеси для таблетирования можно спрессовать непосредственно или с помощью роликового пресса с получением таблеток. Смеси для таблетирования или порции этих смесей перед таблетированием можно альтернативно подвергнуть влажному гранулированию, сухому гранулированию или гранулированию из расплава, отверждению из расплава или экструдированию. Конечная композиция может содержать один или более слоев и может содержать или не содержать покрытие; кроме того, она может быть инкапсулирована.

Парентеральное введение

Панагонист PPAR также можно ввести непосредственно в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Подходящие способы парентерального введения включают внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутритекальное, внутрижелудочковое, внутриуретральное, внутристернальное, внутрочерепное, внутримышечное, внутрисиновиальное и подкожное введение. Подходящие устройства для парентерального введения включают игольные (в том числе микроигольные) инъекторы, безыгольные инъекторы и инфузионные устройства.

Парентеральные композиции в характерном случае являются водными растворами, которые могут содержать наполнители, такие как соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно для поддержания pH в диапазоне от 3 до 9), но для некоторых прикладных задач более подходящими могут быть стерильный неводный раствор или сухая форма для использования совместно с подходящим носителем, таким как стерильная, апиrogenная вода.

Приготовление парентеральных композиций в стерильных условиях, например посредством лиофилизации, легко может быть выполнено с использованием стандартных фармацевтических способов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Растворимость панагониста PPAR, используемого для приготовления парентеральных растворов, можно повысить за счет использования подходящих способов составления композиций, таких как включение агентов, повышающих растворимость, или подходящих технологий, таких как SMEDDS (само-микроэмульгирующаяся система доставки лекарственных средств; от англ. Self Micro Emulsifying Drug Delivery System).

Композиции для парентерального введения могут быть составлены как композиции с непосредственным и/или модифицированным высвобождением. Композиции с модифицированным высвобождением включают композиции с отсроченным, непрерывным, пульсирующим, контролируемым, направленным и программированным высвобождением. Панагонист PPAR может быть включен в композицию в форме суспензии или в твердой, полутвердой форме или в форме тиксотропной жидкости для введения в форме имплантируемого депо, обеспечивающего модифицированное высвобождение активного соединения. Примеры таких композиций включают стенты, покрытые лекарственным средством, и полутвердые формы и суспензии, содержащие нагруженные лекарственным средством микросферы из поли-dl-молочной-со-гликолевой кислоты (PGLA; от англ. poly(dl-lactic-co-glycolic)acid).

Ингаляционное/интраназальное введение

Панагонист PPAR также можно ввести интраназально или посредством ингаляции, в характерном случае - в форме сухого порошка (отдельно, в форме смеси, например в форме сухой смеси с лактозой, или в форме частицы из смешанных компонентов, например в смеси с фосфолипидами, такими как фосфатидилхолин) из ингалятора сухого порошка, в форме распыляемого аэрозоля из контейнера, находящегося под давлением, насоса, распылителя, атомизатора (предпочтительно из атомизатора, в котором для получения тонкого тумана используют электрогидродинамику) или небулайзера, с использованием или без использования подходящего пропеллента, например 1,1,1,2-тетрафторэтана или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропана, или в форме назальных капель. При интраназальном применении порошок может содержать биоадгезивный агент, например-хитозан или циклодекстрин.

Контейнер под давлением, насос, распылитель, атомизатор или небулайзер содержит раствор или суспензию панагониста PPAR, содержащие, например, этанол, водный раствор этанола или подходящий альтернативный агент для диспергирования, солюбилизации или продолжительного высвобождения активного вещества, пропеллент (или пропелленты) в качестве разбавителя и необязательное поверхностно-активное вещество, например сорбитана триолеат, олеиновую кислоту или олигомолочную кислоту.

Перед употреблением композиции в форме сухого порошка или суспензии лекарственный продукт микронизируют до размера, подходящего для доставки посредством ингаляции (в характерном случае - менее 5 мкм). Это может быть обеспечено любым подходящим способом тонкого измельчения, таким как размол на спиральной струйной мельнице, размол на струйной мельнице с кипящим слоем, переработ-

ка сверхкритической жидкости с получением наночастиц, гомогенизация высокого давления или сушка распылением.

Капсулы (изготовленные, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), блистеры и картриджи для использования в ингаляторе или инсуффляторе можно приготовить так, чтобы они содержали порошкообразную смесь панагониста PPAR, подходящей порошкообразной основы, например лактозы или крахмала, и модификатора эксплуатационных свойств, например L-лейцина, маннитола или стеарата магния. Лактоза может быть безводной или иметь форму моногидрата, предпочтителен второй вариант. Другими подходящими наполнителями являются декстран, глюкоза, мальтоза, сорбитол, ксилитол, фруктоза, сахароза и трегалоза.

Подходящая композиция в форме раствора для использования в атоизаторе на основе электрогидродинамики для получения тонкого тумана может содержать от 1 до 20 мг панагониста PPAR на одно срабатывание, а объем, выделяемый при срабатывании, может варьироваться от 1 до 100 мкл. Типичная композиция может содержать панагонист PPAR, пропиленгликоль, стерильную воду, этанол и хлорид натрия. Альтернативными растворителями, которые можно использовать вместо пропиленгликоля, являются глицерол и полиэтиленгликоль.

Подходящие вкусовые добавки, такие как ментол и левоментол, или подсластители, такие как сахарин или сахаринат натрия, можно добавить к композициям по настоящему изобретению, предназначенным для ингаляционного/интраназального введения.

Композиции для ингаляционного/интраназального введения могут быть составлены так, чтобы они были предназначены для немедленного и/или модифицированного высвобождения, с использованием, например, PGLA. Композиции с модифицированным высвобождением включают композиции с отсроченным, непрерывным, пульсирующим, контролируемым, направленным и программированным высвобождением.

В случае ингаляторов сухого порошка и аэрозолей единица дозирования определяется с помощью клапана, который доставляет отмеренное количество. Устройства по настоящему изобретению в характерном случае устроены так, что они вводят отмеренную дозу или "выброс", содержащий от 1 до 10 мкг панагониста PPAR. Общая дневная доза в характерном случае будет лежать в диапазоне от 1 до 200 мкг, причем ее можно ввести в виде одной дозы или чаще в виде мелких доз в течение дня.

Местное введение

Панагонист PPAR также можно вводить местно - (интра)дермально или трансдермально - через кожу или слизистую оболочку. Типичными композициями, предназначенными для этой цели, являются гели, гидрогели, лосьоны, растворы, кремы, мази, присыпки, повязки, пены, пленки, кожные пластыри, прокладки, имплантаты, губки, волокнистые материалы, бандаж и микроэмульсии. Также могут быть использованы липосомы. Типичные носители включают спирт, воду, минеральное масло, вазелиновое масло, медицинский вазелин, глицерин, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль. Также могут быть включены усилители пенетрации.

Другими способами местного введения являются доставка посредством электропорации, ионофореза, фонофореза, сонофореза и микроигольная или безыгольная (например, Powderject™, Bioject™ и т.п.) инъекция.

Композиции для местного введения могут быть составлены так, чтобы они обеспечивали немедленное и/или модифицированное высвобождение. Композиции с модифицированным высвобождением включают композиции с отсроченным, непрерывным, пульсирующим, контролируемым, направленным и программированным высвобождением.

Пероральный и парентеральный способы введения применимы независимо от типа фибротического состояния. Местное введение применимо в том случае, если фибротическое состояние является, например, системной склеродермией. Ингаляционное/интраназальное введение применимо в том случае, если фибротическое состояние является, например, легочным фиброзом или системной склеродермией.

При пероральном введении панагонист PPAR можно ввести пациенту в дозах, лежащих в диапазоне от примерно 100 до примерно 3000 мг/день, предпочтительно от примерно 500 до примерно 3000 мг/день. Общую дневную дозу можно ввести в виде одной дозы или в виде мелких доз. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению в характерном случае может содержать примерно от 100 до примерно 1000 мг панагониста PPAR, например 100, 200, 500, 750 или 1000 мг панагониста PPAR.

В характерном случае были приготовлены суспензии панагониста PPAR в 1%-ном растворе метилцеллюлозы и в 1%-ном растворе метилцеллюлозы с добавлением 0,5% полоксамера. Также были приготовлены капсулы, содержащие 25, 50 или 200 мг панагониста PPAR. Также были приготовлены композиции для внутривенного введения, в которых панагонист PPAR был растворен в 30 мас.%/70 мас.% PEG400/0.05 М фосфатном буфере, pH 8 (от 25 до 100 мкг/мл).

В варианте осуществления настоящего изобретения, который может быть объединен с любым из предыдущих вариантов осуществления любого из аспектов настоящего изобретения, панагонистом PPAR является 5-хлор-1-[(6-бензотиазолил)сульфонил]-1H-индол-2-бутановая кислота (также обозначаемая как "соединение А". Соединение А и способ его получения описаны в публикации WO 2007/026097. Обна-

ружено, что соединение А активирует все рецепторы PPAR α , PPAR γ и PPAR δ . В контексте настоящего изобретения можно использовать соединение А в форме одной из его фармацевтически приемлемых солей или сольватов. При использовании в контексте настоящего изобретения термин "сольват" обозначает молекулярный комплекс, содержащий соединение А и одну или более фармацевтически приемлемых молекул растворителя, например этанола. Термин "гидрат" используется в том случае, когда растворителем является вода. Фармацевтически приемлемые соли соединения А включают его кислотно-аддитивные и основные соли.

Подходящие кислотно-аддитивные соли получают из кислот, образующих нетоксичные соли. Примерами являются такие соли как ацетат, адипат, аспартат, бензоат, бесилат, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, борат, камсилат, цитат, цикламат, эдисилат, эсилат, формиат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/хлорид, гидробромид/бромид, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафтиллат, 2-напсилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, пироглутамат, сахарат, стеарат, сукцинат, таннат, тартрат, тозилат, трифторацетат и ксинофоат.

Подходящие основные соли получают из оснований, образующих нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамина и цинка. Также можно получить полусоли кислот и оснований, например гемисульфатные и гемикальциевые соли.

Фармацевтически приемлемые соли соединения А могут быть получены одним или более из трех способов:

- (i) посредством проведения реакции соединения с желаемой кислотой или желаемым основанием;
- (ii) посредством удаления защитной группы, лабильной в кислоте или основании, от подходящего предшественника соединения или посредством раскрытия кольца в подходящем циклическом предшественнике, например в лактоне или лактаме, с использованием желаемой кислоты или желаемого основания; или
- (iii) посредством преобразования одной соли соединения в другую в реакции с соответствующей кислотой или основанием или с использованием соответствующей ионообменной колонки.

Все три реакции в характерном случае выполняют в растворе. Полученную соль можно осадить и собрать посредством фильтрации или выделить посредством испарения растворителя. Степень ионизации полученной соли может варьироваться от полной ионизации до, по существу, отсутствия ионизации.

Изобретение далее будет проиллюстрировано следующими примерами.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1.

Эффект соединения А на развитие вызванного тетрахлористым углеродом фиброза печени у мышей и его сравнение с известным агонистом PPAR γ .

Показано (Yao T. et al., Am J Physiol. 1994 Sep;267(3 Pt 1):G476-84), что тетрахлористый углерод (CCl₄) вызывает дисфункцию митохондрий в гепатоцитах и оксидативный стресс в модели на мышцах, что приводит к отложению коллагена и фиброзу печени. Соответственно эффект соединения А и росиглитазона, известного агониста PPAR γ , оценили на модели индуцированного CCl₄ фиброза печени у мышей.

Мышам в течение 22 дней ежедневно перорально вводили соединение А в двух различных дозах (30 и 100 мг/кг/день) и росиглитазон - контрольное соединение, являющееся агонистом PPAR γ , в дозе, равной 5 мг/кг/день. По окончании лечения животных умертвили и получили образцы плазмы крови и печени. Количественно определили отложение коллагена и экспрессию генов, относительно которых известно, что они участвуют в воспалении и фиброзе печени, и измерили уровни нескольких соответствующих плазматических биомаркеров.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄ и получавших перорально носитель в течение 22 дней, был обнаружен фиброз печени, о чем свидетельствовало статистически значимое повышение содержания коллагена в ткани печени. Лечение соединением А статистически значимо снижало фиброз печени на 80% (30 мг/кг/день) и 89% (100 мг/кг/день) соответственно и улучшало показатели по многим соответствующим маркерам. Лечение росиглитазоном снижало фиброз печени всего на 54%, при этом показатели по многим маркерам либо не изменялись, либо ухудшались.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на 56 самцах мышей линии C57BL/6J (JANVIER LABS, C.S. 4105, Saint-Berthevin, Франция), масса тела которых к началу эксперимента лежала в диапазоне от 21 до 24 г. Животных содержали группами, включавшими от 3 до 10 животных, в полипропиленовых клетках (площадь пола составляет 1032 см²), в стандартных условиях: комнатная температура (22±2°C), относительная влажность воздуха (55±10%), цикл "свет/темнота" (12 ч/12 ч), обмен воздуха (15-20 об./ч), вода и корм (SDS, RM1) по потребности. Мышам дали возможность привыкнуть к условиям в течение по меньшей мере 5 дней до начала эксперимента. Мышей пронумеровали, пометив их хвосты несмываемыми маркерами.

Готовые к употреблению суспензии соединения А (3 и 10 мг/мл) и росиглитазона (0,5 мг/мл) храни-

ли при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Готовые к употреблению композиции носителя (метилцеллюлоза 400 сП 1% плюс полочсамер 188 0,1%) также хранили при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Тетрахлористый углерод (CCl_4) (Sigma Chemical Co, Saint Quentin Fallavier, Франция) готовили заново в каждый из дней дозирования в подсолнечном масле (объем/объем 1/11).

Дозирование

Мышей разделили на следующие группы.

1. Подсолнечное масло (два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/носитель (один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 7.
2. Подсолнечное масло (два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 8.
3. Подсолнечное масло (два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/росиглитазон (5 мг/кг/день один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 8.
4. CCl_4 (3,5 мл/кг, два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/носитель (один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 8.
5. CCl_4 (3,5 мл/кг, два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/соединение А (30 мг/кг/день один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 8.
6. CCl_4 (3,5 мл/кг, два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 7.
7. CCl_4 (3,5 мл/кг, два раза в неделю в течение 3 недель, внутрибрюшинно)/росиглитазон (5 мг/кг/день один раз в день в течение 22 дней перорально), n равно 8.

Два раза в неделю в течение 3 недель мышам внутрибрюшинно вводили утром либо 100 мкл CCl_4 (3,5 мл/кг в подсолнечном масле (объем/объем 1/11) или 100 мкл подсолнечного масла. Параллельно мышам перорально лечили один раз в день в течение 22 дней (с дня 0 по день 21) носителем, соединением А или росиглитазоном. В дни одновременных введений носителя, соединения А или росиглитазона и CCl_4 носителя, соединение А или росиглитазон вводили за 6 ч до введения подсолнечного масла или CCl_4 . Вводимый объем исследуемых соединений был равен 10 мл/кг массы тела в случае пероральных введений.

Заключительное получение образцов крови

В день 21 через 2 ч после дозирования животных наркотизировали пентобарбиталом (60 мг/кг, внутрибрюшинно) и получили кровь посредством пункции сердца. У каждого животного записали точное время дозирования и время получения пробы. Пробы крови (0,9 мл цельной крови) поместили в предварительно охлажденные пробирки для сбора крови, содержавшие 2 мл литий-гепарина. Пробы крови осторожно перемешали, поместили в колотый лед и центрифугировали в пределах 30 мин после сбора крови при примерно 1500 g в течение 10 мин при температуре, равной примерно $+4^{\circ}\text{C}$. В каждом образце крови полученную плазму разделили на 2 аликвоты (по меньшей мере 100 мкл каждая) и перенесли с использованием одноразового полимерного материала в полипропиленовые пробирки. Пробы немедленно поставили в вертикальном положении в морозильную камеру, где они хранились при -20°C .

После заключительного забора крови удалили ткань печени:

первый образец ткани (примерно 50 мг) получили, зафиксировали параформальдегидом и хранили при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$;

второй образец ткани (200 мг) заморозили в жидком азоте и хранили при -20°C .

Измеренные параметры

Коллаген.

Для количественного определения коллагена срезы окрасили красителем пикросириус красным и докрасили гематоксилином Майера. Все срезы оцифровали и 5 неперекрывающихся полей из 3 различных среза случайным образом проанализировали с использованием программы Image J (версия 1.42, N.I.H., США). Анализ всех срезов выполнил один экспериментатор строго в одних и тех же условиях.

Экспрессия генов.

Экстракцию мРНК выполнили на маленьких замороженных образцах печени (50-100 мг). Коротко говоря, образцы криогенно измельчили с использованием ступки и пестика. Затем образцы гомогенизировали с использованием мрамора (2×5 мм) и 1 мл лизирующего реагента Qiazol (Qiagen Ref 79306) в аппарате Retsch MM300. Экстракцию РНК из гомогенатов печени закончили с использованием набора Qiagen Rneasy Lipid Kit (Ref 74804) в соответствии с инструкциями производителя. Количество РНК определили с использованием Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific), а качество РНК подтвердили с помощью биоанализатора (2100 Agilent Technology).

Синтез кДНК способом случайных праймеров выполнили на 100 нг тотальной РНК с использованием набора Iscript (BIORAD ref 170-8891) согласно инструкциям производителя. ПЦР в реальном времени выполнили с 7,5 нг РНК эквивалентов на системе детектирования последовательностей ABI Prism 7900 (APPLIED BIOSYSTEMS) с использованием Iq Taq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) и специализированных QPCR праймеров. Для некоторых мРНК транскриптов количественное определение выполнили с использованием зондов TaqMan, меченных флуорохромом FAM, и с использованием Uni-

versal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSYSTEMS, ref 4324020). Праймеры, использованные в анализах, перечислены в приведенной ниже таблице.

Наименование мишени	Полное наименование мишени	Наименования праймеров	Последовательности (5'-3')
Rplp0	Рибосомальный белок, большой, P0	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacacccat (SEQ ID NO 1) gtgaggctcctctggtgaa (SEQ ID NO 2)
Tgfb1	Трансформирующий фактор роста бета 1	MTgfb1FW MTgfb1REV	accggcccttctgctctc (SEQ ID NO 3) gccgcacacagcagttctc (SEQ ID NO 4)
Col1a1	Коллаген, тип 1, альфа 1	MCol1a1FW MCol1a1REV	aaaggtgctgatggttctcc (SEQ ID NO 5) gggaccgggaggaccactgg (SEQ ID NO 6)
Fn1	Фибронектин 1	MFn1FW MFn1REV	gtgtctgacgctggcttaag (SEQ ID NO 7) cccacttctccgatcttga (SEQ ID NO 8)
Acta 2 (α-SMA)	Актин, альфа 2, гладкие мышцы, аорта	Macta2FW Macta2REV	cagggagtaatggttgaatg (SEQ ID NO 9) tttccatgctgccagttg (SEQ ID NO 10)
Ccl2 (MCP-1)	Хемокин (С С мотив), лиганд 2	MCcl2FW MCcl2REV	aggtccctgctatgctctg (SEQ ID NO 11) gcctactcattgggatcatc (SEQ ID NO 12)

ПЦР в реальном времени выполнили на аппарате ABI PRISM 7900. Необработанные данные с ABI7900 экспортировали в текстовый формат. Анализ выполнили с использованием Excel, относительное количество транскриптов рассчитали с использованием способа "Delta Delta CT" (Livak et al., Methods 2001), используя Rplp0 в качестве конститутивного гена для нормализации и усредненные данные от животных, не получавших лечения (группа, получавшая носитель) в качестве сравнительного контроля. Все образцы РНК подвергли обратной транскрипции и количественно оценили в трех параллельных опытах.

Биомаркеры печени

Протокол экстракции белков печени.

Экстракция с использованием T-PER®: реагент для экстракции тканевых белков, № продукта 78510 (партия: NG174004), производства компании Thermo Scientific, с ингибитором протеазы Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, без ЭДТА (100X) - № продукта 78425 - партия № NL178051, производства компании Thermo Fischer.

Образцы печени и супернатанты во время эксперимента держали на льду. Для экстракции производитель рекомендует использовать 10 мг ткани на 100 мкл T-Per плюс 1 мкл "Halt-protease" (100X).

Приготовили 50 мл буфера T-Per, к которым добавили 500 мкл "Halt-protease" (100X), и смесь держали на льду. Только что размороженные образцы печени массой от 50 до 70 мг взвесили, нарезали на мелкие кусочки и добавили 1 мл холодного фосфатного буферного раствора для промывания ткани. Смесь центрифугировали при 500 g в течение 5 мин при 4°C и супернатант удалили в отходы. Добавили 100 мкл/10 мг T-Per с антипротеазами (100X) и измельчили печень гомогенизатором Поттера, сделав 5-6 оборотов вверх и вниз. Смесь центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант удалили, разделили на аликвоты и хранили при -20°C для последующего измерения биомаркеров. Образцы по 10 мкл использовали для дозирования белков в BCA-способе после разбавления водой в соотношении

1/10 согласно процедуре, описанной в MOS: BAP-03-062-01 (набор BCA - набор для анализа белков Pierce BCA - Pierce Thermo Scientific, Ref: 23225).

Все белки количественно определили с использованием набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA; от англ. enzyme-linked immunosorbent assay) согласно инструкциям производителей.

TIMP-1: TIMP-1 мыши, R&B SYSTEMS®, Ref:TM100.

TGF-β1: набор для иммунологического анализа на TGF-β1 мыши/крысы/свиньи/собаки Quantikine, R&D SYSTEMS®, ref: MB100B.

Обработка и статистический анализ данных

Все параметры проанализировали с использованием программы Graphpad (версия 5.1). Параметры анализировали следующим образом:

с использованием t-теста Стьюдента для независимых образцов для сравнения группы 1 с группой 4 с целью валидации эксперимента (эффект CCl₄);

с использованием t-теста Стьюдента для независимых образцов для сравнения группы 1 с группой 2 и группы 1 с группой 3 с целью исследования эффекта соединения А или росиглитазона по отдельности;

с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (от англ. analysis of variation) (обработка) для сравнения группы 4 с группами, получавшими соединение А (5, 6), с целью исследования эффекта соединения А на индуцированный CCl₄ фиброз печени; если обнаруживали, что результаты ANOVA были статистически значимыми, использовали тест Даннета;

с использованием t-теста Стьюдента для независимых образцов для сравнения группы 4 с группой, получавшей лечение росиглитазоном (группа 7), с целью исследования эффекта росиглитазона на индуцированный CCl₄ фиброз печени.

На фиг. 1-7

* обозначает значение $p < 0,05$;

** обозначает значение $p < 0,01$;

*** обозначает значение $p < 0,001$.

Результаты

1) Триглицериды плазмы.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо снизило триглицериды в плазме по сравнению с носителем ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно), тогда как росиглитазон повысил уровни триглицеридов в плазме, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 1).

2) Отложение коллагена.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо снизило уровни коллагена по сравнению с носителем (-80%, $p < 0,01$ и -89%, $p < 0,001$ соответственно), и росиглитазон также статистически значимо снизил уровни коллагена (-54%, $p < 0,05$), фиг. 2.

3) Экспрессия TGFβ-1.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию TGFβ-1 по сравнению с носителем ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно), тогда как росиглитазон статистически значимо повысил экспрессию TGFβ-1 ($p < 0,001$), фиг. 3.

4) Экспрессия коллагена I типа, альфа I (Col1a).

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию Col1a по сравнению с носителем ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно), тогда как росиглитазон повысил экспрессию Col1a, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 4).

5) Экспрессия α-SMA.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (100 мг/кг/день) ингибировало экспрессию α-SMA по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как росиглитазон повысил экспрессию α-SMA, но уровень статистической значимости также не был достигнут (фиг. 5).

6) Экспрессия MCP-1.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию MCP-1 по сравнению с носителем ($p < 0,05$), тогда как росиглитазон не оказывал эффекта (фиг. 6).

7) Экспрессия фибронектина.

У мышей, подвергнутых воздействию CCl₄, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию фибронектина по сравнению с носителем ($p < 0,001$), тогда как росиглитазон повысил экспрессию фибронектина, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 7).

Приведенные выше результаты показывают, что пероральное введение соединения А (30 или 100 мг/кг/день) в течение 22 дней самцам мышей линии C57BL/6J снизило фиброз печени, вызванный CCl₄. С использованием этого соединения был получен дозозависимый эффект, и максимальное 90%-ное

снижение уровней коллагена наблюдали при введении соединения А в дозе 100 мг/кг/день; эта же доза значительно улучшала показатели по большинству ассоциированных маркеров. В противоположность этому, росиглитазон оказал значительно менее выраженный эффект, причем чаще всего не оказывал эффекта на другие маркеры.

Пример 2.

Эффект соединения А на развитие гломерулонефрита, вызванного антителами к клубочковой базальной мембране, у мышей и сравнение с известными агонистами PPAR γ и с известным ингибитором АПФ.

Вызванный антителами к клубочковой базальной мембране (GBM; от англ. Glomerular Basement Membrane) гломерулонефрит у мышей - это часто используемая модель *in vivo* для оценки эффективности новых химических соединений против СКД. Соответственно на этой модели оценили эффект соединения А, росиглитазона и пиоглитазона (известных агонистов PPAR) и каптоприла (известного ингибитора АПФ - ангиотензинпревращающего фермента).

Мышам ежедневно в течение 7 дней вводили соединение А в двух различных дозах (30 и 100 мг/кг/день), контрольные соединения-агонисты PPAR γ росиглитазон (3 мг/кг/день) и пиоглитазон (30 мг/кг/день) и контрольное соединение-ингибитор АПФ каптоприл в дозе 10 мг/кг/день. В конце лечения животных умертвили и получили образцы плазмы и почек. Количественно оценили экспрессию генов, относительно которых известно, что они участвуют в СКД, и измерили уровни показателей функции почек в плазме.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, которым перорально вводили носитель в течение 7 дней, развились гломерулонефрит и фиброз, о чем свидетельствуют статистически значимое возрастание уровня мочевины в моче, альбуминурия, повышение уровня остеопонтинина в почках, уровня белка MCP-1 в почках, повышение экспрессии мРНК Col1 и Col3 по сравнению с группой мышей, получавших только носитель. Лечение соединением А в дозах, равных 30 и 100 мг/кг/день, в течение 7 дней снизило уровни мочевины в моче, альбуминурию, количество остеопонтинина в почках, количество белка MCP-1 в почках, экспрессию мРНК Col1 и Col3 по сравнению с группой мышей, получавшей только носитель (результаты являются статистически значимыми для дозы, равной 100 мг/кг/день). При сравнении показано, что каптоприл оказал сходный с соединением А эффект на уровень мочевины в моче, альбуминурию, уровень остеопонтинина в почках, уровень белка MCP-1 в почках, но не вызвал статистически значимого снижения экспрессии Col1 и Col3; однако росиглитазон и пиоглитазон статистически значимо повысили уровни остеопонтинина и MCP-1 в почках по сравнению с группой мышей, получавшей только носитель.

Материалы и методы

Эксперименты провели с использованием самок мышей линии C57BL/6J (CERJ Janvier, route des Chenes secs, Le Genest Saint Isle, Франция) в возрасте от 8 до 10 недель в начале эксперимента. Животных случайным образом распределили по полипропиленовым клеткам (площадь пола составляет 1032 см²) группами по 3-4, исходя из массы тела. Мышам нанесли индивидуальные метки на уши. Животным дали возможность привыкнуть в течение недели до начала эксперимента к стандартным условиям: комнатная температура (22±2°C), относительная влажность воздуха (55±10%), цикл "свет/темнота" (12 ч/12 ч), обмен воздуха (15-20 об./ч), вода и корм (SDS, RM1) по потребности.

Готовые к употреблению суспензии соединения А (3 и 10 мг/мл, что соответствовало дозам, равным 30 и 100 мг/кг соответственно) в носителе (1% метилцеллюлозы (METOLOSE SM400, 400 сП) плюс 0,1% Poloxamer 188) хранили при 5°C до использования.

Готовые к употреблению суспензии росиглитазона (0,3 мг/мл, что соответствовало дозе, равной 3 мг/кг) в носителе хранили при 5°C до использования.

Готовые к употреблению суспензии пиоглитазона (3 мг/мл, что соответствовало дозе, равной 30 мг/кг) в носителе хранили при 5°C до использования.

Готовые к употреблению суспензии каптоприла (1 мг/мл, что соответствовало дозе, равной 10 мг/кг) в носителе хранили при 5°C до использования.

Препарат антител IgG овцы (ab37385, Abcam) перенесли при 4°C на лед. Антитела растворили в физиологической сыворотке с получением раствора с концентрацией 4 мг/мл. Отдельно гомогенизировали полный адьювант Фрейнда (CFA, от англ. complete Freund's adjuvant) при помощи вихревой мешалки. Шприц с наконечником "Luer Lock" объемом 5 мл заполнили 2,5 мл CFA. Другой шприц с наконечником "Luer Lock" объемом 5 мл заполнили 2,5 мл раствора IgG овцы. Оба шприца соединили с иглой для получения микроэмульсий, удалив все пузырьки воздуха. Раствор IgG овцы перенесли в CFA. Смесь многократно перекачивали из одного шприца в другой в течение 5 мин, пока не обнаружили заметное возрастание сопротивления. Затем иглу для получения микроэмульсий заменили переходником из нержавеющей стали с двумя "женскими" частями разъемов "Luer Lock". Смесь снова перекачивали из одного шприца в другой в течение нескольких минут. Затем определили поверхностное натяжение водного раствора. Заполнили шприцы с разъемами "Luer Lock" объемом по 1 мл, полностью удалив пузырьки воздуха. Надели на шприцы иглы калибра 23G и хранили шприцы при 4°C до использования.

Сыворотку овцы с антителами к почечным клубочкам (GBM) (PTX-001S, Probetex) хранили при 5°C до использования.

Дозирование

Мышей разделили на следующие группы.

Группа	Количество мышей	Иммунизация эмульсией IgG/HR37Ra овцы	Нагрузочное антитело к GBM	Лечение
1	10	200 мкг/500 мкг	Нет	Носитель
2	10		300 мкл	Носитель
3	10			Каптоприл 10 мг/кг
4	10			Росиглитазон 3 мг/кг
5	10			Пиоглитазон 30 мг/кг
6	10			Соединение А 30 мг/кг
7	10			Соединение А 100 мг/кг

За 5 дней до введения антитела к GBM животных иммунизировали посредством подкожной инъекции в три участка тела (по одной инъекции в каждое бедро и одна инъекция в заднюю часть шеи) 100 мкл эмульсии IgG овцы/CFA (200 мкг IgG овцы/500 мкг H37Ra *Mycobacterium tuberculosis*) под анестезией смесью O₂/изофлурана (1 л/3%).

В день 0 мышей взвесили и поместили примерно на 20-30 мин под инфракрасный ламповый обогреватель, чтобы добиться вазодилатации каудальных вен и лучшей их видимости для инъекции. Подвижность каждого животного ограничили, поместив его в конус для инъекций. Мышам выполнили внутривенную инъекцию 300 мкл сыворотки, содержащей антитела к GBM. Затем мышам перорально ввели соединение А, росиглитазон, пиоглитазон и каптоприл и продолжали лечение один раз в день (утром) в течение следующих 7 дней. Мышей взвешивали примерно через каждые два дня.

В день 6 мышей взвесили и перенесли в ящик для измерения диуреза, где они оставались в течение 24 ч. Салфетки взвешивали до и после диуреза, чтобы измерить количество поглощенной воды. В день 7 мышей взвесили, дали перорально лекарство и вернули в исходную клетку. Мочу собрали, центрифугировали, измерили и заморозили несколько аликвот при -80°C для последующих анализов (на мочевины, креатинин, альбумин и т.п.).

В полдень дня 7 мышей анестезировали смесью O₂/изофлурана (1 л/3%) и провели забор проб крови из ретроорбитального синуса пипеткой Пастера. По 400 мкл цельной крови поместили в сухие микропробирки. После свертывания в течение 30 мин и 2 центрифугирования при 6000 об/мин в течение 15 мин при 4°C получили сыворотки. Сыворотки разделили на аликвоты и заморозили при -80°C для последующих анализов (на мочевины, креатинин, белки, адипонектин). Затем мышей подвергли эвтаназии посредством цервикальной дислокации и удалили и взвесили почки. Отделили кору одной почки у каждого животного. Маленькие кусочки сохранили для последующего анализа экспрессии РНК, подробно описанного ниже. Остаток непосредственно заморозили в жидком азоте для последующих анализов (TGF-beta-1, OPN, MCP-1 ...). Половину оставшейся почки поместили в отдельную гистологическую кассету в 10%-ный забуференный раствор формалина на 24 ч для гистологического анализа.

Измеренные параметры

Экспрессия генов.

Экстракцию мРНК выполнили на маленьких замороженных образцах ткани почки (50-100 мг). Коротко говоря, образцы криогенно измельчили при помощи ступки и пестика. Затем образцы гомогенизировали с использованием мрамора (2×5 мм) и 1 мл лизирующего реагента Qiazol (Qiagen Ref 79306) в аппарате Retsch MM300. Экстракцию РНК из гомогенатов почек завершили с использованием набора Qiagen Rneasy Lipid Kit (Ref. 74804) согласно инструкциям производителя. Количество РНК определили с использованием Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific), а качество РНК подтвердили с использованием биоанализатора (2100 Agilent Technology).

Синтез кДНК способом случайных праймеров выполнили на 100 нг тотальной РНК с использованием набора Iscript (BIORAD ref 170-8891) согласно инструкциям производителя. ПЦР в реальном времени

выполнили с 7,5 нг РНК эквивалентов на системе детектирования последовательностей ABI Prism 7900 (APPLIED BIOSYSTEMS) с использованием Iq iTaq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) и специализированных QPCR праймеров. Для некоторых мРНК транскриптов количественное определение выполнили с использованием зондов TaqMan, меченных флуорохромом FAM, и с использованием Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSYSTEMS, ref 4324020). Праймеры, использованные в анализах, перечислены в приведенной ниже таблице.

Наименование мишени	Полное наименование мишени	Наименования праймеров	Последовательности (5'-3')
Rplp0	Рибосомальный белок, большой, P0	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacaccat (SEQ ID NO 1) gtgaggtcctccttggtgaa (SEQ ID NO 2)
Tgfb1	Рецептор трансформирующего фактора роста бета I	MTgfb1FW MTgfb1REV	ggtcttgcccatctcacat (SEQ ID NO 13) caacaggtccatttttctca (SEQ ID NO 14)
Col1a1	Коллаген, тип I, альфа 1	MCol1a1FW MCol1a1REV	aaagtgctgatggttctcc (SEQ ID NO 5) gggaccgggaggaccactgg (SEQ ID NO 6)
Col3a1	Коллаген, тип III, альфа 1	MCol3a1FW MCol3a1REV	gggatcaaatgaaggcgaat (SEQ ID NO 15) tggtagtctcattgccttgc (SEQ ID NO 16)

ПЦР в реальном времени выполнили на аппарате ABI PRISM 7900. Необработанные данные с ABI7900 экспортировали в текстовый формат. Анализ выполнили с использованием Excel, относительное количество транскриптов рассчитали с использованием способа "Delta Delta CT" (Livak et al., Methods 2001), используя Rplp0 в качестве конститутивного гена для нормализации и усредненные данные от животных, не получавших лечения (группа, получающая носитель) в качестве сравнительного контроля. Все образцы РНК подвергли обратной транскрипции и количественно оценили в трех параллельных опытах.

Биомаркеры мочи, плазмы и почек

Анализы плазмы и мочи (мочевина, креатинин, альбумин и белки) выполнили с использованием аппарата Konelab и соответствующих колориметрических тестов.

Микроальбинурию проанализировали с использованием набора для исследования флуоресценции: Albumin Blue Fluorescent Assay (Active Motif, Ref: 15002).

Все белки почки количественно определяли с использованием набора для ELISA согласно инструкциям производителя:

остеопонтин: иммунологический анализ на остеопонтин у мышей Quantikine, R&D SYSTEMS®, Ref: MOST00,

MCP-1: набор для ELISA у мышей Quantikine Mouse CCL2/JE/MCP-1, R&D SYSTEMS®, Ref: MJR00.

Обработка и статистический анализ данных

Все параметры проанализировали с использованием программы Graphpad (версия 5.1). Параметры анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (обработка) для сравнения групп 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7. Если обнаруживали, что результаты ANOVA были статистически значимыми, то использовали тест Даннета для сравнения группы 2 с остальными группами.

На фиг. с 8 по 16

* обозначает значение $p < 0,05$;

** обозначает значение $p < 0,01$;

*** обозначает значение $p < 0,001$.

Результаты

1) Мочевина в сыворотке.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически

значимо снизило уровни мочевины по сравнению с носителем ($p < 0,01$), тогда как каптоприл снизил уровень мочевины, но уровень статистической значимости не был достигнут, а росиглитазон и пиоглитазон повысили уровни мочевины, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 8).

2) Объем мочи.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) снизило объем мочи по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как каптоприл также снизил объем мочи, но уровень статистической значимости не был достигнут, а росиглитазон и пиоглитазон повысили уровень альбумина в моче, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 9).

3) Альбумин в моче.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) снизило уровни альбумина по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как каптоприл также снизил уровни альбумина, но уровень статистической значимости не был достигнут, росиглитазон повысил уровни альбумина, но уровень статистической значимости не был достигнут, а пиоглитазон статистически значимо повысил уровни альбумина ($p < 0,001$), фиг. 10.

4) Остеопонтин в почках.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо снизило уровни остеопонтинина по сравнению с носителем ($p < 0,05$), тогда как каптоприл также статистически значимо снизил уровни остеопонтинина ($p < 0,05$), а росиглитазон и пиоглитазон статистически значимо повысили уровни остеопонтинина ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно), фиг. 11.

5) MCP-1 в почках.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо снизило уровни MCP-1 по сравнению с носителем ($p < 0,001$), тогда как каптоприл также статистически значимо снизил уровни MCP-1 ($p < 0,01$), а росиглитазон и пиоглитазон статистически значимо повысили уровни MCP-1 ($p < 0,05$), фиг. 12.

6) Экспрессия TGF β R-1.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию TGF β R-1 по сравнению с носителем ($p < 0,01$), тогда как каптоприл не оказал эффекта на экспрессию TGF β R-1, а росиглитазон и пиоглитазон повысили экспрессию TGF β R-1, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 13).

7) Экспрессия коллагена типа I, альфа I (Col1a).

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию Col1a по сравнению с носителем ($p < 0,01$), тогда как каптоприл не оказал эффекта на экспрессию Col1a, а росиглитазон и пиоглитазон статистически значимо повысили экспрессию Col1a ($p < 0,001$), фиг. 14.

8) Экспрессия коллагена типа III, альфа I (Col3a).

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию Col3a по сравнению с носителем ($p < 0,001$), тогда как каптоприл не оказал эффекта на экспрессию Col3a, а росиглитазон и пиоглитазон повысили экспрессию Col3a ($p < 0,001$), но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 15).

9) Патологические почечные клубочки.

У мышей, подвергнутых воздействию антител к GBM, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо снизило количество патологических почечных клубочков ($p < 0,001$), фиг. 16.

Пример 3.

Эффект соединения А на развитие индуцированного блеомицином легочного фиброза у мышей и сравнение с известным агонистом PPAR γ .

Индуцированный блеомицином легочный фиброз у мышей - это модель *in vivo*, которую часто используют для оценки антифибротической эффективности новых химических соединений (Corbel et al., 2001; Manougu et al., 2006). Соответственно на этой модели оценили эффект соединения А и росиглитазона, известного агониста PPAR γ . Для оценки эффекта исследуемых соединений были выбраны мыши линии C57BL/6J, поскольку они подвержены развитию раннего воспалительного ответа в легких с последующим фибротическим ремоделированием после введения блеомицина.

Мышам ежедневно перорально в течение 15 дней вводили соединение А в двух различных дозах (30 и 100 мг/кг/день) и росиглитазон в дозе, равной 5 мг/кг/день. В конце лечения животных умертвили и получили пробы плазмы и печень. Количественно оценили экспрессию генов, относительно которых известно, что они участвуют в процессе воспаления в легких, и измерили уровни в плазме показателей функции легких.

У подвергнутых воздействию блеомицина мышей, которым перорально вводили носитель в течение 15 дней, развился легочный фиброз, о чем свидетельствует статистически значимое повышение уровней остеопонтинина, MCP-1 и TIMP-1 в легких. Лечение соединением А в дозах, равных 30 и 100 мг/кг/день, в течение 15 дней статистически значимо снизило уровни TIMP-1 в легких по сравнению с носителем;

уровни MCP-1 и остеопонтин в легких также снизились по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут. В противоположность этому, в случае когда подвергнутых воздействию блеомицина мышей ежедневно перорально лечили росиглитазоном в дозе, равной 5 мг/кг/день, в течение 15 дней, уровни MCP-1 и TIMP-1 в легких возросли по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены с использованием 77 самцов мышей линии C57BL/6J (JANVIER LABS, C.S. 4105, Saint-Berthevin F-53941, Франция), масса тела которых составляла от 20 до 25 г в начале эксперимента. Животных поселили группами по 3-10 в полипропиленовые клетки (площадь пола составляет 1032 см²) в стандартных условиях: комнатная температура (22±2°C), относительная влажность воздуха (55±10%), цикл "свет/темнота" (12 ч/12 ч), обмен воздуха (15-20 об./ч), вода и корм (SDS, RM1) по потребности. Мышам позволили адаптироваться к этим условиям в течение по меньшей мере 5 дней до начала эксперимента. Мышей пронумеровали, пометив их хвосты несмываемыми маркерами.

Соединение А (3 и 10 мг/мл) и росиглитазон (0,5 мг/мл) были приготовлены в 1% метилцеллюлозе (METOLOSE SM400, 400 сП) плюс 0,1% Poloxamer 188 в форме готовых к употреблению суспензий и во время исследования хранились при 5±3°C. 1% метилцеллюлозу (METOLOSE SM400, 400 сП) плюс 0,1% Poloxamer 188 использовали в качестве носителя и хранили при 5±3°C во время исследования. Блеомицин (Laboratoire Bellon) растворяли в 0,9% растворе NaCl (CDM Lavoisier, Франция) непосредственно перед использованием.

Дозирование

Мышей разделили на следующие группы:

- 1) 0,9% NaCl плюс носитель (один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 11;
- 2) 0,9% NaCl плюс соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 11;
- 3) 0,9% NaCl плюс росиглитазон (5 мг/кг/день один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 11;
- 4) блеомицин (0,3 мг) плюс носитель (один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 10;
- 5) блеомицин (0,3 мг) плюс соединение А (30 мг/кг/день один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 9;
- 6) блеомицин (0,3 мг) плюс соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 7;
- 7) блеомицин (0,3 мг) плюс росиглитазон (5 мг/кг/день один раз в день в течение 15 дней перорально), n равно 6.

В день 1 мышей анестезировали этомидатом (15-20 мг/кг, внутривенно) и затем интраназально ввели блеомицина сульфат (0,3 мг (300 МЕ) в 0,9% NaCl (50 мкл/мышь (25 мкл/ноздрию)) или 0,9% NaCl (50 мкл/мышь (25 мкл/ноздрию)). Мышей лечили перорально один раз в день в течение 15 дней (с дня 0 по день 14) носителем, соединением А или росиглитазоном. Введение носителя, соединения А или росиглитазона в день 1 выполнили за 6 ч до введения 0,9% NaCl или блеомицина. Вводимый объем исследуемых соединений был равен 10 мл/кг массы тела при пероральных введениях.

Заключительное получение проб крови

В день 14 через 2 ч после дозирования животных анестезировали пентобарбиталом (60 мг/кг, внутривенно) и собрали кровь, выполнив пункцию сердца. Для каждого животного записали точное время введения дозы и время получения проб крови. Пробу крови (0,9 мл цельной крови) поместили в предварительно замороженные пробирки для сбора крови объемом 2 мл с покрытием из литий-гепарина. Пробы крови осторожно перемешали, поместили в колотый лед и центрифугировали в пределах 30 мин после сбора крови при примерно 1500 g в течение 10 мин при температуре, примерно равной +4°C. Плазму, полученную из каждой пробы крови, разделили на две аликвоты (по меньшей мере по 100 мкл каждая) и перенесли с использованием одноразового полимерного материала в полипропиленовые пробирки. Пробы сразу же в вертикальном положении поместили в морозильную камеру, где они хранились при -20°C.

Удаление легких

После заключительного отбора проб крови удалили легочную ткань.

Первый образец ткани (средняя доля) получили, зафиксировали параформальдегидом и хранили при 5±3°C.

Второй образец ткани (правая доля) заморозили в жидком азоте и хранили при -20°C.

Измеренные параметры

Коллаген.

Для количественного определения коллагена срезы окрасили красителем пикросириус красным и докрасили гематоксилином Майера. Все срезы оцифровали и 5 неперекрывающихся полей из 3 различных срезов случайным образом проанализировали с использованием программы Image J (версия 1.42, N.I.H., США). Анализ всех срезов выполнил один экспериментатор строго в одних и тех же условиях.

Экспрессия генов.

Экстракцию мРНК выполнили на маленьких замороженных образцах легких (50-100 мг). Коротко говоря, образцы криогенно измельчили с использованием ступки и пестика. Затем образцы гомогенизировали с использованием мрамора (2×5 мм) и 1 мл лизирующего реагента Qiazol (Qiagen Ref 79306) в аппарате Retsch MM300. Экстракцию РНК из гомогенатов легких закончили с использованием набора Qiagen Rneasy Lipid Kit (Ref 74804) в соответствии с инструкциями производителя. Количество РНК определили с использованием Nanodrop (ND2000 Thermo Scientific), а качество РНК подтвердили с помощью биоанализатора (2100 Agilent Technology).

Синтез кДНК способом случайных праймеров выполнили на 100 нг тотальной РНК с использованием набора Iscript (BIORAD ref 170-8891) согласно инструкциям производителя. ПЦР в реальном времени выполнили с 7,5 нг РНК эквивалентов на системе детектирования последовательностей ABI Prism 7900 (APPLIED BIOSYSTEMS) с использованием Iq iTaq SYBR Green Universal Rox (Ref 1725124 Biorad) и специализированных QPCR праймеров. Для некоторых мРНК транскриптов количественное определение выполнили с использованием зондов TaqMan, меченных флуорохромом FAM, и с использованием Universal PCR MasterMix No AmpErase UNG (APPLIED BIOSYSTEMS, ref 4324020). Праймеры, использованные в анализах, перечислены в приведенных ниже таблицах.

Наименование мишени	Полное наименование мишени	Наименования праймеров	Последовательности (5'-3')
Rplp0	Рибосомальный белок, большой, P0	Fw2Rplp0 PE Rev2Rplp0 PE	ctgatgggcaagaacacccat (SEQ ID NO 1) gtgaggctctccttggtgaa (SEQ ID NO 2)
Tgfb1	Рецептор трансформирующего фактора роста бета I	MTgfb1FW MTgfb1REV	ggtctgcccattctcacat (SEQ ID NO 13) caacaggttccattttctca (SEQ ID NO 14)
Col1a1	Коллаген, тип I, альфа 1	Mcol1a1FW Mcol1a1REV	aaaggtgctgatggttctcc (SEQ ID NO 5) gggaccgggaggaccactgg (SEQ ID NO 6)
Col3a1	Коллаген, тип III, альфа 1	Mcol3a1FW	gggatcaaatgaaggcgaat (SEQ ID NO 15)
		Mcol3a1REV	tgggtagtctcattgccttgc (SEQ ID NO 16)
Spp1 (остеопонтин)	Секретируемый фосфопротеин 1	MSpp1FW MSpp1REV	ctccaatcgccctacagtc (SEQ ID NO 17) ggtcctcatctgtggcatca (SEQ ID NO 18)
Ccl2 (MCP-1)	Хемокин (C-C мотив) лиганд 2	MCcl2FW MCcl2REV	aggtccctgtcatgctctg (SEQ ID NO 11) gcctactcattgggatcatc (SEQ ID NO 12)
Fn1	Фибронектин 1	MFn1FW MFn1REV	gttgtctgacgctggcttaag (SEQ ID NO 19) cccacttctctccgatcttga (SEQ ID NO 20)

Наименование мишени	Полное наименование мишени	Идент. № анализа_ зонд Taqman
Timp-1	TIMP ингибитор металлопептидазы 1	Mm01341361_m1

ПЦР в реальном времени выполнили на аппарате ABI PRISM 7900. Необработанные данные с ABI7900 экспортировали в текстовый формат. Анализ выполнили с использованием Excel, относительное количество транскриптов рассчитали с использованием способа "Delta Delta CT" (Livak et al., Methods 2001), используя Rp1p0 в качестве конститутивного гена для нормализации и усредненные данные от животных, не получавших лечения (группа, получающая носитель) в качестве сравнительного контроля. Все образцы РНК подвергли обратной транскрипции и количественно оценили в трех параллельных опытах.

Биомаркеры легочных белков

Протокол экстракции легочных белков.

Экстракция с использованием T-PER®: реагент для экстракции тканевых белков, № продукта 78510 (партия: NG174004), производства компании Thermo Scientific, с ингибитором протеазы Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail, без ЭДТА (100X) - № продукта 78425 - партия № NL178051, производства компании Thermo Fischer.

Образцы ткани легкого и супернатанты во время эксперимента держали на льду. Для экстракции производитель рекомендует использовать 10 мг ткани на 100 мкл T-Per плюс 1 мкл "Halt-protease" (100X).

Приготовили 50 мл буфера T-Per, к которому добавили 500 мкл "Halt-protease" (100X), и смесь держали на льду. Только что размороженные образцы легкого массой от 50 до 70 мг взвесили, нарезали на мелкие кусочки и добавили 1 мл холодного фосфатного буферного раствора для промывания ткани. Смесь центрифугировали при 500 g в течение 5 мин при 4°C и супернатант удалили в отходы. Добавили 100 мкл/10 мг T-Per с антипротеазами (100X) и измельчили легкое гомогенизатором Поттера, сделав 5-6 оборотов вверх и вниз. Смесь центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин при 4°C. Супернатант удалили, разделили на аликвоты и хранили при -20°C для последующего измерения биомаркеров. Образцы по 10 мкл использовали для дозирования белков в BCA-способе после разбавления водой в соотношении 1/10 согласно процедуре, описанной в MOS: BAP-03-062-01 (набор BCA - набор для анализа белков Pierce BCA - Pierce Thermo Scientific, Ref: 23225).

Все белки количественно определили с использованием набора для ELISA согласно инструкциям производителя:

остеопонтин: иммунологический анализ на остеопонтин у мышей Quantikine, R&D SYSTEMS®, Ref: MOST00,

MCP-1: набор для ELISA у мышей Quantikine Mouse CCL2/JE/MCP-1, R&D SYSTEMS®, Ref: MJR00,

TIMP-1: TIMP-1 мыши, R&B SYSTEMS®, Ref:TM100.

Обработка и статистический анализ данных

Все параметры проанализировали с использованием программы Graphpad (версия 5.1). Параметры анализировали следующим образом:

с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (обработка) для сравнения групп 1, 2 и 3; если обнаруживали, что результаты FNOVA были статистически значимыми, то использовали тест Даннета для сравнения группы 1 с группой 2 и группой 3;

с использованием однофакторного ANOVA (обработка) для сравнения групп 1, 4, 5, 6 и 7; если обнаруживали, что результаты ANOVA были статистически значимыми, то использовали тест Даннета для сравнения группы 1 с группой 4, с группой 5, с группой 6 и с группой 7).

На фиг. с 17 по 27

* обозначает значение $p < 0,05$;

** обозначает значение $p < 0,01$;

*** обозначает значение $p < 0,001$.

Результаты

1) Отложение коллагена.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо снизило уровни отложения коллагена по сравнению с носителем ($p < 0,05$). Росиглитазон также статистически значимо снизил уровни коллагена ($p < 0,05$), фиг. 17.

2) TIMP-1 в легких.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 мг/кг/день и 100 мг/кг/день) статистически значимо снизило уровни TIMP-1 по сравнению с носителем ($p < 0,05$), тогда как росиглитазон повысил уровни TIMP-1, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 18).

3) МСР-1 в легких.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) снизило уровни МСР-1 по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как росиглитазон повысил уровни МСР-1, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 19).

4) Остеопонтин в легких.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) снизило уровни остеопонтина по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как росиглитазон повысил уровни остеопонтина, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 20).

5) Экспрессия TGF β R-1.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию TGF β R-1 по сравнению с носителем ($p < 0,05$). Росиглитазон также статистически значимо ингибировал экспрессию TGF β R-1 ($p < 0,05$), фиг. 21.

6) Экспрессия коллагена I типа, альфа I (Col1a).

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию Col1a по сравнению с носителем ($p < 0,001$), тогда как росиглитазон повысил экспрессию Col1a, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 22).

7) Экспрессия коллагена III типа, альфа I (Col3a).

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию Col3a по сравнению с носителем ($p < 0,001$), тогда как росиглитазон ингибировал экспрессию Col3a, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 23).

8) Экспрессия TIMP-1.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) ингибировало экспрессию Col1a по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как росиглитазон статистически значимо повысил экспрессию TIMP-1 ($p < 0,05$), фиг. 24.

9) Экспрессия МСР-1.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) ингибировало экспрессию МСР-1 по сравнению с носителем, но уровень статистической значимости не был достигнут, тогда как росиглитазон повысил экспрессию TIMP-1, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 25).

10) Экспрессия остеопонтина.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (30 и 100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию остеопонтина по сравнению с носителем ($p < 0,05$), тогда как росиглитазон не оказал эффекта на остеопонтин (фиг. 26).

11) Экспрессия фибронектина.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, соединение А (100 мг/кг/день) статистически значимо ингибировало экспрессию фибронектина по сравнению с носителем ($p < 0,05$), тогда как росиглитазон повысил экспрессию фибронектина, но уровень статистической значимости не был достигнут (фиг. 27).

Приведенные выше результаты показывают, что пероральное введение соединения А (30 или 100 мг/кг/день) самцам мышей линии C57BL/6J уменьшило повышение уровней воспалительных/фибротических биомаркеров, индуцированное инстилляцией блеомицина в легкие, тогда как росиглитазон не оказал эффекта либо оказал даже вредный эффект на эти биомаркеры. В совокупности эти данные показывают, что соединение А снижает индуцированный блеомицином легочный фиброз у мышей.

Пример 4.

Эффект соединения А на развитие индуцированного блеомицином фиброза кожи у мышей и сравнение с известным агонистом PPAR γ .

Соединение А испытали на модели индуцированного блеомицином фиброза кожи у мышей. Мышей в течение 21 дня ежедневно перорально лечили соединением А в двух различных дозах (30 и 100 мг/кг/день) и контрольным соединением - агонистом PPAR γ росиглитазоном в дозе, равной 5 мг/кг/день. В конце лечения животных умертвили и взяли образцы кожи. Количественно определили экспрессию генов, относительно которых известно, что они участвуют в пути системного фиброза, и определили толщину дермы и содержание в ней коллагена.

У мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, которых перорально лечили носителем в течение 21 дня, развился фиброз кожи, о чем свидетельствует статистически значимое увеличение толщины дермы и содержания коллагена. Лечение соединением А в дозах, равных 30 и 100 мг/кг/день, в течение 21 дня значимо снизило толщину дермы и содержание коллагена по сравнению с носителем. Сходный эффект наблюдали у мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, которых перорально лечили росиглитазоном в дозе, равной 5 мг/кг/день, в течение 21 дня, хотя эффект в отношении толщины дермы был менее выраженным.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 6-недельных самцах мышей линии C57BL/6 (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Франция). Животных поселили группами по 3-10 в полипропиленовые клетки (площадь пола составляет 1032 см²) в стандартных условиях: комнатная температура (22±2°C), относительная влажность воздуха (55±10%), цикл "свет/темнота" (12 ч/12 ч), обмен воздуха (15-20 об./ч), вода и корм (SDS, RM1) по потребности. Мышам позволили адаптироваться к этим условиям в течение по меньшей мере 5 дней до начала эксперимента. Мышей пронумеровали, пометив их хвосты несмываемыми маркерами.

Соединение А (3 и 10 мг/мл) и росиглитазон (0,5 мг/мл) приготовили в 1% метилцеллюлозе (METOLOSE SM400, 400 сП) плюс 0,1% Poloxamer 188 в форме готовых к употреблению суспензий и во время исследования хранили при 5±3°C. 1% метилцеллюлозу (METOLOSE SM400, 400 сП) плюс 0,1% Poloxamer 188 использовали в качестве носителя и хранили при 5±3°C во время исследования.

Дозирование

Мышей разделили на следующие группы:

- 1) 0,9% NaCl плюс носитель (один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 7;
- 2) 0,9% NaCl плюс соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 8;
- 3) 0,9% NaCl плюс соединение А (30 мг/кг/день один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 8;
- 4) блеомицин (0,3 мг) плюс росиглитазон (5 мг/кг/день один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 8;
- 5) блеомицин (0,3 мг) плюс носитель (один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 6;
- 6) блеомицин (0,3 мг) плюс соединение А (100 мг/кг/день один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 7;
- 7) блеомицин (0,3 мг) плюс соединение А (30 мг/кг/день один раз в день в течение 21 дня перорально), n равно 7.

Фиброз кожи вызывали ежедневными инъекциями блеомицина (100 мкл блеомицина (Laboratoire Bellon, Франция) растворяли в 0,9% NaCl (CDM Lavoisier, Франция) в концентрации, равной 0,5 мг/мл, и вводили 6 дней в неделю в определенные зоны площадью 1 см² в верхней части спины). 0,9% NaCl использовали как контроль (подкожные инъекции 100 мкл).

Мышам перорально вводили один раз в день в течение 21 дня носитель, соединение А или росиглитазон. Введение носителя, соединения А или росиглитазона в день 1 выполнили за 4 ч до введения 0,9% NaCl или блеомицина.

Получение образцов кожи

В день 21 мышей умертвили посредством цервикальной дислокации, получили образцы кожи и обработали их для анализа.

Измеренные параметры

Толщина дермы и подкожной жировой клетчатки.

Поврежденные области кожи иссекли, зафиксировали в 4%-ном формалине и залили в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрасили гематоксилином и эозином. Толщину дермы проанализировали при 100-кратном увеличении посредством измерения расстояния между эпидермально-дермальным соединением и соединением между дермой и подкожной жировой клетчаткой в четырех участках поврежденной кожи у каждой мыши. Два независимых исследователя проводили оценку до консенсуса в случае вариабельности измерений, превышавшей 10%.

Содержание коллагена в коже

Анализ на гидроксипролин.

Содержание коллагена в поврежденных образцах кожи определили посредством анализа на гидроксипролин. После обработки пункционных биоптатов (Ø 3 мм) 6М раствором HCl в течение 3 ч при 120°C рН образцов довели до 7 с 6М раствором NaOH. После этого образцы смешали с 0,06 М хлорамидом Т и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем добавили 3,15 М перхлорной кислоты и 20% п-диметиламинобензальдегид и инкубировали образцы в течение следующих 20 мин при 60°C. Оптическую плотность определили при длине волны, равной 557 нм, микропланшетным спектрофотометром Spectra MAX 190 (Molecular Devices, Калифорния, США).

Анализ Sircol.

Общее содержание растворимого коллагена в супернатантах клеточных культур количественно определили с использованием анализа на коллаген Sircol (Biocolor). Коротко говоря, супернатант клеточной культуры смешали с красителем сириус красный и оставили на 30 мин при комнатной температуре. После центрифугирования гранулу осадка растворили в щелочном реагенте. Измерение выполнили с использованием микропланшетного спектрофотометра SpectraMax 190 (Molecular Devices) при длине волны, равной 540 нм.

Обработка и статистический анализ данных

Данные выразили как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Для статистических анали-

зов использовали t-тест Стьюдента. Значение p менее 0,05 считали статистически значимым результатом.

На фиг. с 28 по 30

* обозначает значение $p \leq 0,05$;

** обозначает значение $p < 0,01$;

*** обозначает значение $p < 0,001$.

Результаты

Инъекция блеомицина мышам привела к увеличению толщины дермы по сравнению с мышами, получавшими NaCl (см. фиг. 28: увеличение на 57% в группе, получавшей блеомицин плюс носитель, по сравнению с группой, получавшей NaCl плюс носитель). Росиглитазон и соединение А (30 мг/кг) статистически значимо снизили толщину дермы у мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, по сравнению с мышами, получавшими носитель ($p \leq 0,05$). Соединение А (100 мг/кг) более значимо уменьшило толщину дермы у мышей, подвергнутых воздействию блеомицина, по сравнению с носителем ($p < 0,001$).

В соответствии с уменьшением толщины дермы содержание гидроксипролина в поврежденной коже у мышей, получавших лечение соединением А (30 и 100 мг/кг/день) и росиглитазоном, было статистически значимо ниже, чем в поврежденной коже мышей, получавших носитель; соединение А (30 мг/кг) было более эффективным, чем росиглитазон (фиг. 29).

Соединение А (30 и 100 мг/кг/день) и росиглитазон также статистически значимо снизили содержание коллагена по сравнению с носителем (фиг. 30).

В совокупности эти результаты показывают, что соединение А эффективно предотвращает фиброз кожи. Соединение А (100 мг/кг) оказывает даже более выраженные эффекты на толщину дермы по сравнению с росиглитазоном.

Пример 5.

Активация PPAR рецепторов человека и мыши соединением А.

Способность соединения А активировать все три подтипа PPAR рецепторов определили посредством анализов с временной трансактивацией. Эти анализы на клеточной основе выполнили с использованием клеток Cos-7, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей химерный рецептор PPAR α -Gal4 человека или мыши (либо PPAR δ -Gal4, либо PPAR γ -Gal4) и 5Gal4 pGL3 TK Luc репортерной плазмидой. Трансфекции выполнили с помощью химического агента (Jet PEI). Трансфицированные клетки распределили по 384-луночным планшетах и дали им возможность восстановиться в течение 24 ч. Затем культуральную среду удалили и добавили свежую среду, содержащую соединение, подлежащее испытанию (5 мкМ) (конечная концентрация варьировалась от 10^{-4} М до 3×10^{-10} М). После инкубации в течение ночи измерили экспрессию люциферазы посредством добавления SteadyGlo согласно инструкциям производителя (Promega). В качестве контролей использовали фенофибровую кислоту в концентрации 10^{-5} М, GW501516 в концентрации 10^{-8} М и росиглитазон в концентрации 10^{-6} М. Результаты выразили в процентах активности по сравнению с контролями (фенофибровая кислота для PPAR α , росиглитазон для PPAR γ и GW501516 для PPAR δ), принятыми за 100%. Для рецепторов человека результаты являются средним значением по 6 экспериментам, каждый из которых состоял из 4 параллельных опытов. Для рецепторов мыши результаты являются средним значением по 5 (PPAR δ) или 6 (PPAR α и PPAR γ) экспериментам, каждый из которых состоял из 4 параллельных опытов. Кривые "доза-эффект" и EC₅₀ были рассчитаны с использованием программы Assay Explorer (MDL). Результаты представлены в таблице, приведенной ниже, на фиг. 31 и фиг. 32.

	PPAR α		PPAR γ		PPAR δ	
	Человек	Мышь	Человек	Мышь	Человек	Мышь
EC ₅₀	0,92	0,29	0,18	0,17	0,53	2*
(мкМ)						

*: расчетное значение (плато не достигнуто)

Эти результаты показывают, что соединение А активирует все три подтипа рецепторов PPAR с EC₅₀ менее 1 мкМ для каждого подтипа. Кроме того, можно видеть, что соединение А имеет сбалансированную активность между тремя подтипами PPAR рецепторов.

В целом результаты примеров с 1 по 5 свидетельствуют о том, что для обеспечения панагонистического эффекта необходима хорошая агонистическая активность в отношении PPAR δ совместно с агонистической активностью в отношении PPAR α и PPAR γ , чтобы оказывать панантифибротический эффект.

Пример 6.

Эффект соединения А на пролиферацию легочных и дермальных фибробластов и сравнение с известными агонистами PPAR γ и PPAR α .

Способность соединения А ингибировать индуцированную PDGF пролиферацию легочных и дермальных фибробластов определили путем выполнения анализов с включением EdU (5-этинил-2'-дезоксисуридина). Эти анализы были выполнены с использованием первичных фибробластов легких или кожи человека (Promocell). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах в полной культуральной

среде в течение 24 ч с последующим голоданием в течение 24 ч в бессывороточной среде. Затем среду заменили свежей средой, содержащей PDGF и исследуемое соединение А (в концентрациях, варьировавшихся от 10^{-4} М до $4,5 \times 10^{-8}$ М), на следующие 24 ч. EdU добавили к клеткам на последние 16 ч обработки соединением. Затем культуральную среду удалили, клетки зафиксировали формальдегидом и включенный в ДНК делящихся клеток EdU количественно определили с использованием флуоресцентного анализа Click-it согласно инструкциям производителя (Invitrogen). Фенофибровую кислоту в концентрациях, варьировавшихся от 3×10^{-4} М до $1,4 \times 10^{-7}$ М (PPAR α), и росиглитазон в концентрациях, варьировавшихся от 3×10^{-5} М до $1,4 \times 10^{-8}$ М (PPAR γ), использовали в качестве контролей. Результаты выразили как % EdU-позитивных клеток от общего числа клеток. Результаты представляют собой среднее из трех параллельных биологических опытов. Кривые "доза-эффект" и значения IC₅₀ рассчитали с использованием программы GraphPad Prism. Результаты представлены в таблице, приведенной ниже, и на фиг. 33 и 34.

	Соединение А		Фенофибровая кислота		Росиглитазон	
	Легкое	Дерма	Легкое	Дерма	Легкое	Дерма
IC ₅₀ (мкМ)	10,90	11,50	NC	NC	NC	NC

NC: не конвергирует

Пример 7.

Эффект соединения А на переход фибробластов в миофибробласты в случае легочных и дермальных фибробластов и сравнение с известными агонистами PPAR γ и PPAR α .

Способность соединения А ингибировать вызванный TGF β переход легочных и дермальных фибробластов в миофибробласты (FMT; от англ.: fibroblasts to myofibroblasts transition) определили посредством проведения иммуногистохимических анализов на маркер миофибробластов - гладкомышечный α -актин (α -SMA; от англ. α -smooth muscle actin). Эти анализы выполнили с использованием первичных легочных или кожных фибробластов человека (Promocell). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах в полной культуральной среде в течение 24 ч с последующим голоданием в течение 24 ч в бессывороточной среде. Затем среду заменили свежей средой, содержащей TGF β и исследуемое соединение А (в концентрациях, варьировавшихся от 10^{-4} М до $4,5 \times 10^{-8}$ М), на следующие 48 ч. Затем культуральную среду удалили, клетки зафиксировали формальдегидом и окрасили первичным антителом мыши против α -SMA (Sigma) и вторичным антителом козы против антител мыши, меченным флуоресцентной меткой (Invitrogen). Экспрессию α -SMA количественно определили с использованием программы Meta Xpress. Фенофибровую кислоту в концентрациях, варьировавшихся от 3×10^{-4} М до $1,4 \times 10^{-7}$ М (PPAR α), и росиглитазон в концентрациях, варьировавшихся от 3×10^{-5} М до $1,4 \times 10^{-8}$ М (PPAR γ), использовали в качестве контролей. Результаты выразили как % α -SMA-позитивных клеток от общего числа клеток. Данные нормализовали относительно обработки только TGF β , которую приняли за 100%. Результаты представляют собой среднее по трем параллельным биологическим опытам. Кривые "доза-эффект" и значения IC₅₀ рассчитали с использованием программы GraphPad Prism. Результаты представлены в таблице, приведенной ниже, и на фиг. 35 и 36.

	Соединение А		Фенофибровая кислота		Росиглитазон	
	Легкое	Дерма	Легкое	Дерма	Легкое	Дерма
IC ₅₀ (мкМ)	10,79	~11,18	NC	NC	NC	NC

NC: не конвергирует

В совокупности эти функциональные данные, полученные *in vitro*, демонстрируют, что соединение А эффективно ингибирует индуцированную PDGF пролиферацию и индуцированный TGF β переход в миофибробласты первичных легочных и дермальных фибробластов человека, обеспечивая таким образом связь с антифибротическими эффектами, наблюдавшимися *in vivo*. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что панагонизм относительно PPAR может превосходить активацию одиночных PPAR в отношении антифибротических эффектов в клетках-мишенях, связанных с двумя ключевыми фиброгенными путями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение панагониста рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR), для лечения фибротического состояния, где панагонистом PPAR является 5-хлор-1-[(6-бензотиазол)сульфонил]-1H-индол-2-бутановая кислота.

2. Применение по п.1, где фибротическое состояние является состоянием, поражающим любой ор-

ган, в котором может развиваться фиброз, такой как сердце, легкое, печень, почка, желудочно-кишечный тракт, кожа.

3. Применение по п.1 или 2, где фибротическое состояние выбрано из фиброза печени, стеатоза печени, неалкогольного стеатогепатита, хронической болезни почек, фибротического заболевания легких и системной склеродермии.

4. Применение по п.3, где фибротическое состояние является фибротическим заболеванием легких.

5. Применение по п.4, где фибротическое заболевание легких является идиопатическим легочным фиброзом.

6. Применение по п.3, где фибротическое состояние является системной склеродермией.

7. Применение по любому из пп.1-6, где указанный панагонист PPAR предназначен для перорального введения.

8. Применение фармацевтической композиции, содержащей панагонист PPAR, для лечения фибротического состояния, где панагонистом PPAR является 5-хлор-1-[(6-бензотиазолил)сульфонил]-1Н-индол-2-бутановая кислота.

9. Применение по п.8, где фибротическое состояние является состоянием, поражающим любой орган, в котором может развиваться фиброз, такой как сердце, легкое, печень, почка, желудочно-кишечный тракт, кожа.

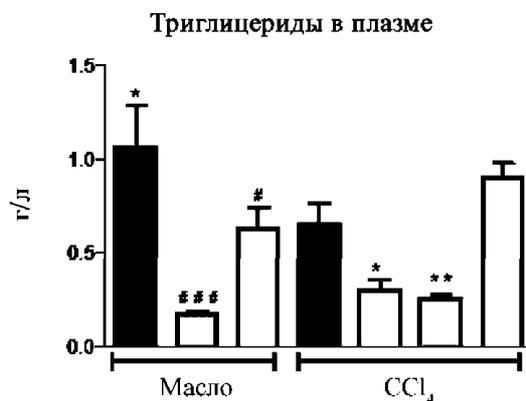
10. Применение по п.8 или 9, где фибротическое состояние выбрано из фиброза печени, стеатоза печени, неалкогольного стеатогепатита, хронической болезни почек, фибротического заболевания легких и системной склеродермии.

11. Применение по п.10, где фибротическое состояние является фибротическим заболеванием легких.

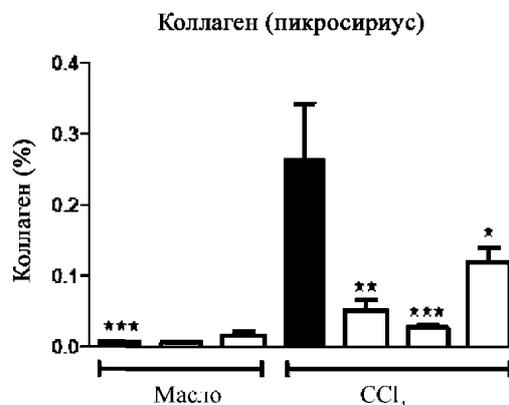
12. Применение по п.11, где фибротическое заболевание легких является идиопатическим легочным фиброзом.

13. Применение по п.10, где фибротическое состояние является системной склеродермией.

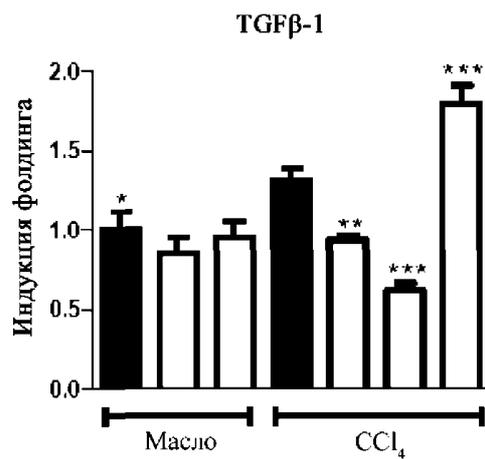
14. Применение по любому из пп.8-13, где фармацевтическая композиция является композицией для перорального, парентерального, местного, ингаляционного или интраназального введения.



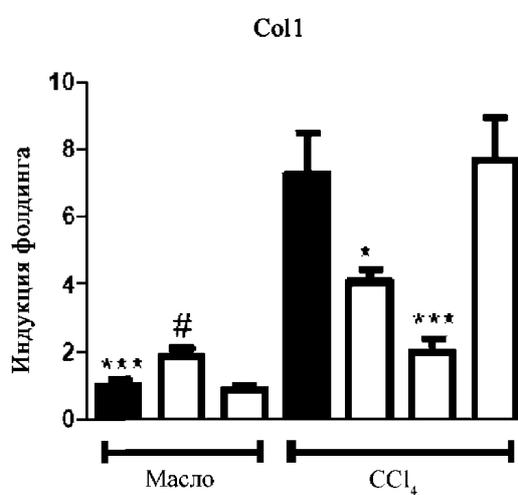
Фиг. 1



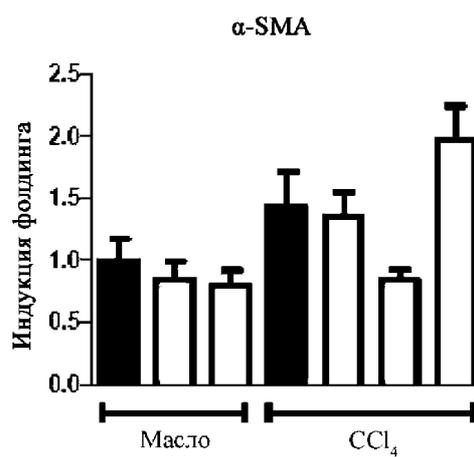
Фиг. 2



Фиг. 3

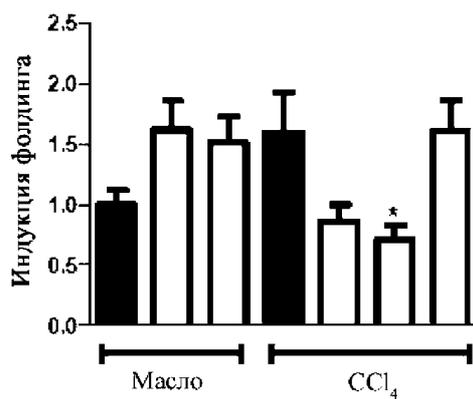


Фиг. 4



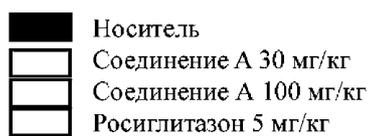
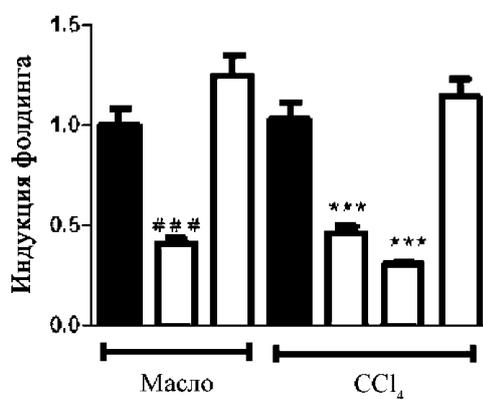
Фиг. 5

MCP-1



Фиг. 6

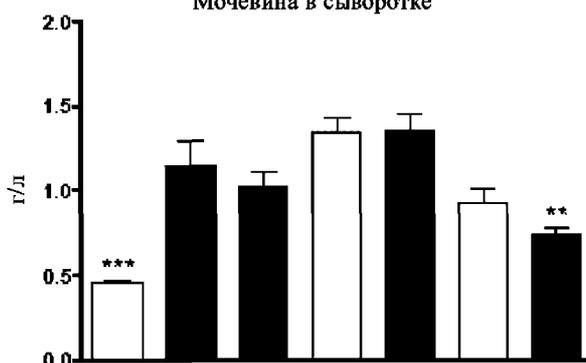
Фибронектин



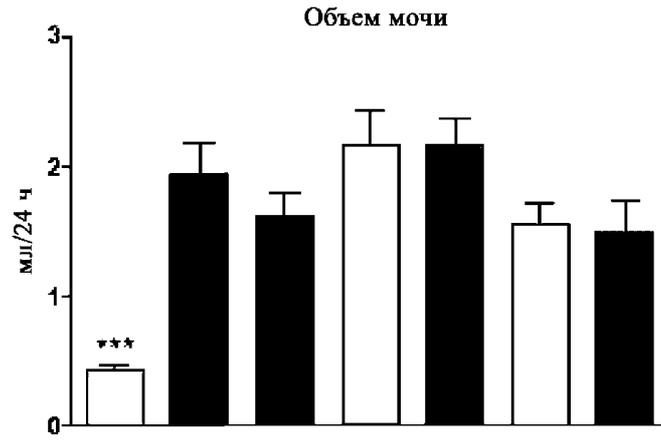
Условные обозначения к фигурам с 1 по 7

Фиг. 7

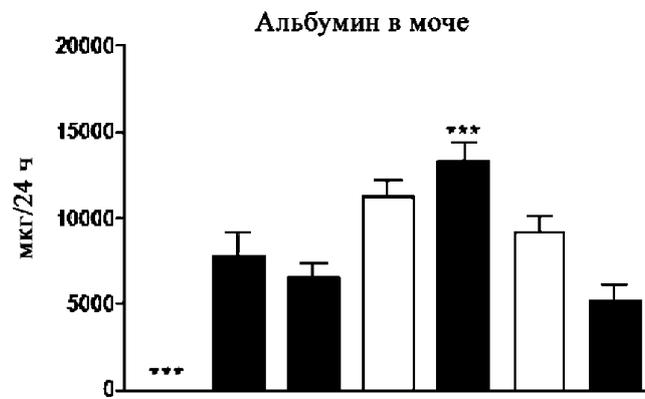
Мочевина в сыворотке



Фиг. 8



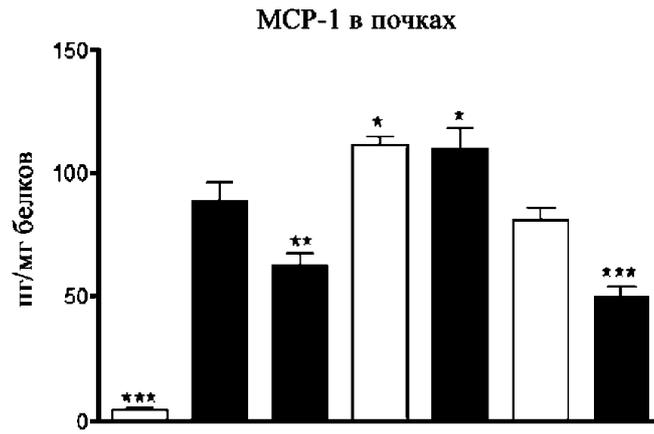
Фиг. 9



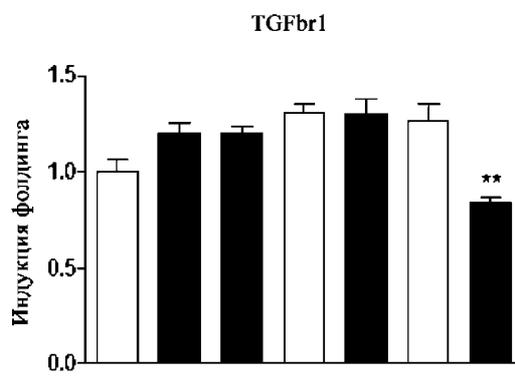
Фиг. 10



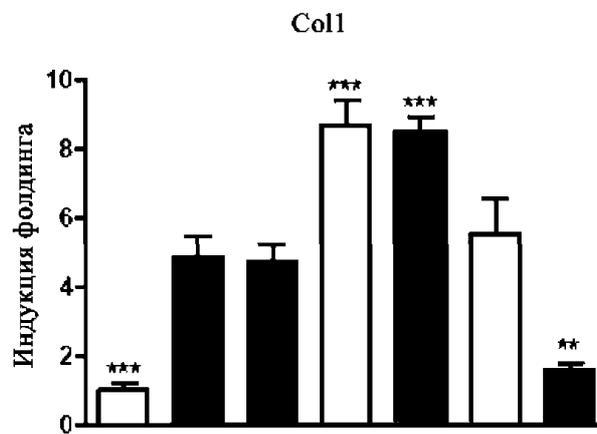
Фиг. 11



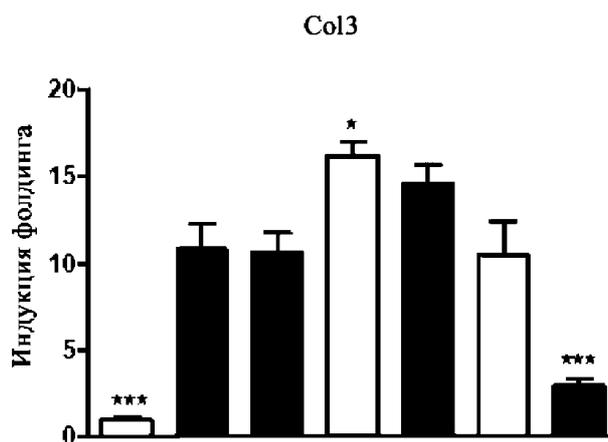
Фиг. 12



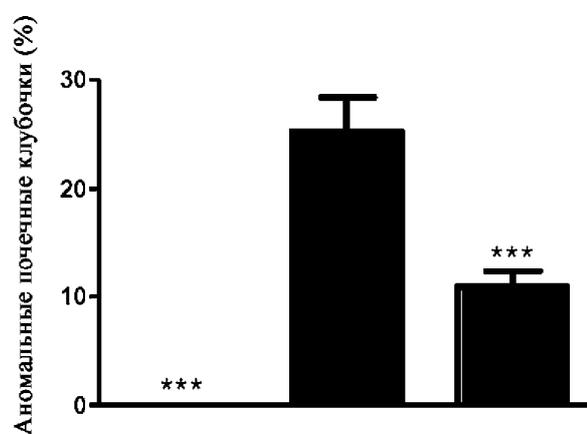
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

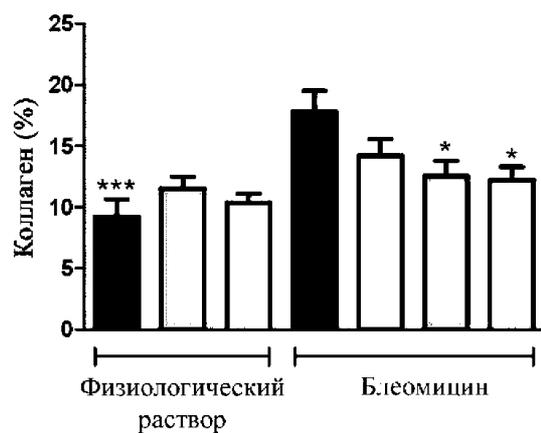


- Без антител к GBM
- Антитела к GBM плюс носитель
- Антитела к GBM плюс Каптоприл 10 мг/кг
- Антитела к GBM плюс Росиглитазон 3 мг/кг
- Антитела к GBM плюс Пиоглитазон 30 мг/кг
- Антитела к GBM плюс Соединение А 30 мг/кг
- Антитела к GBM плюс Соединение А 100 мг/кг

Условные обозначения к фигурам с 8 по 16

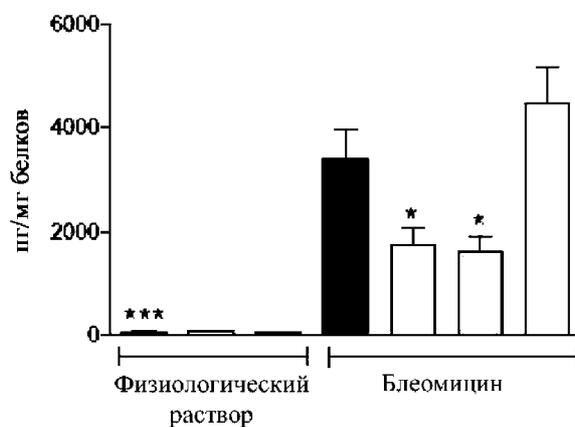
Фиг. 16

Отложение коллагена (пикросириус)



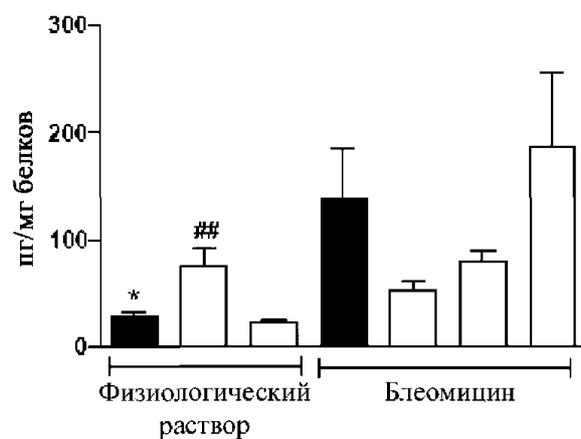
Фиг. 17

TIMP-1 в легких



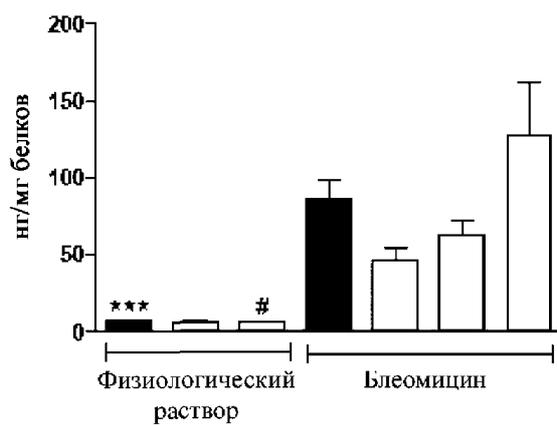
Фиг. 18

MSP-1 в легких

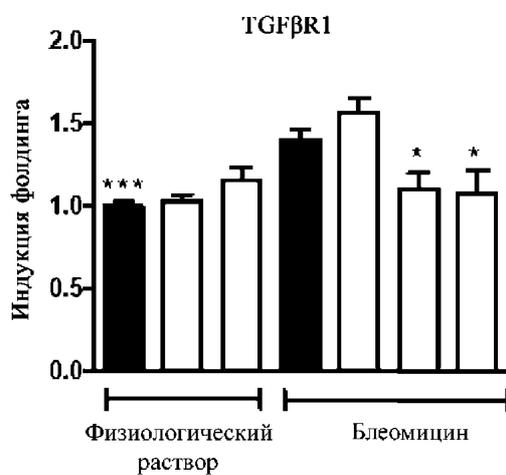


Фиг. 19

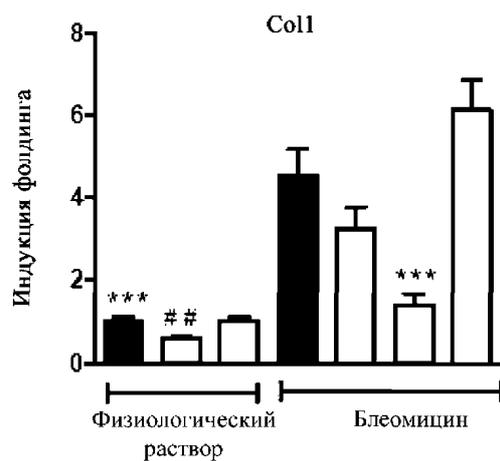
Остеопонтин в легких



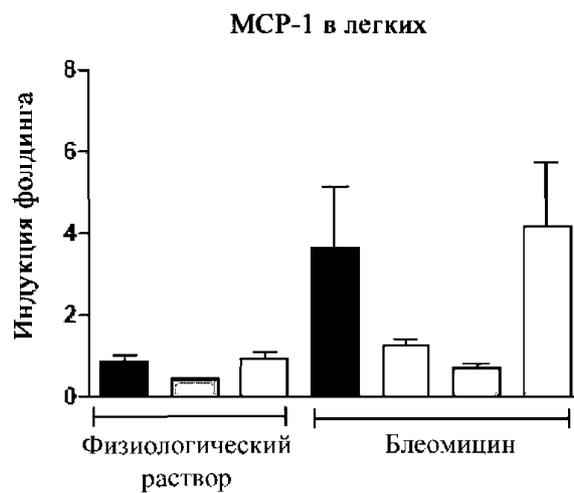
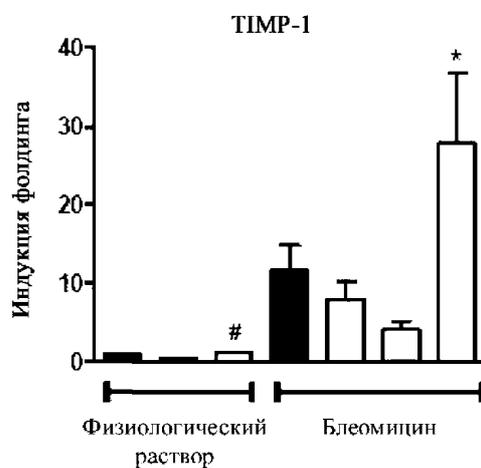
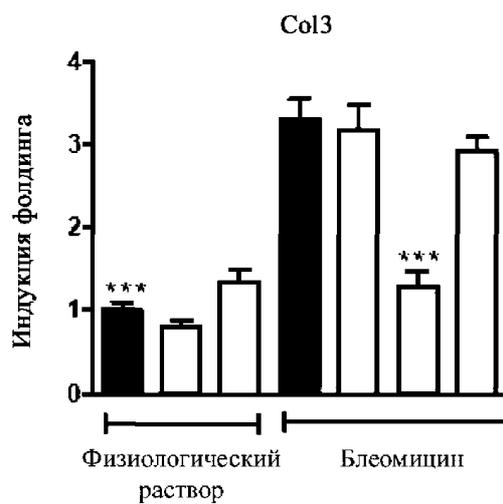
Фиг. 20

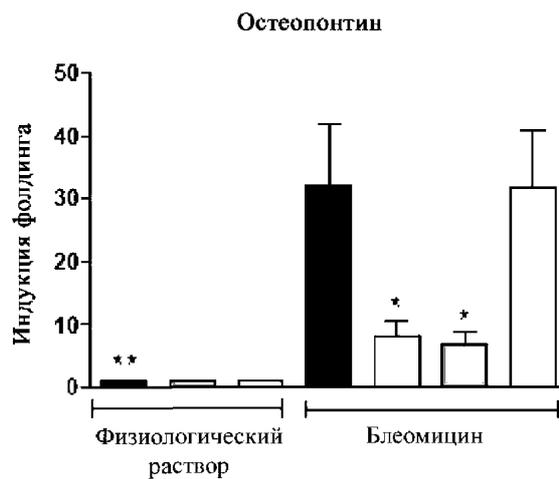


Фиг. 21

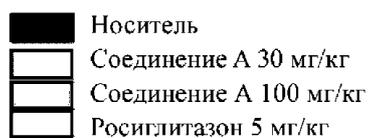
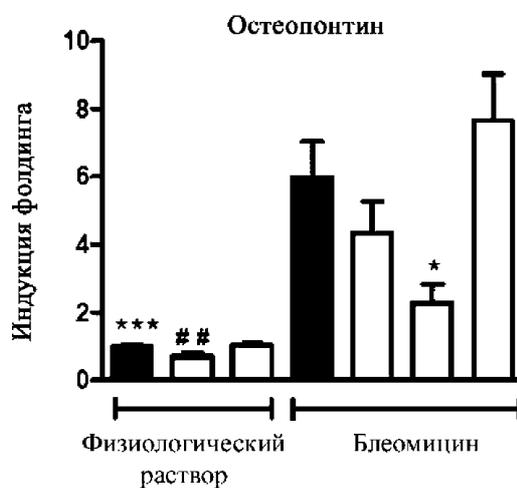


Фиг. 22



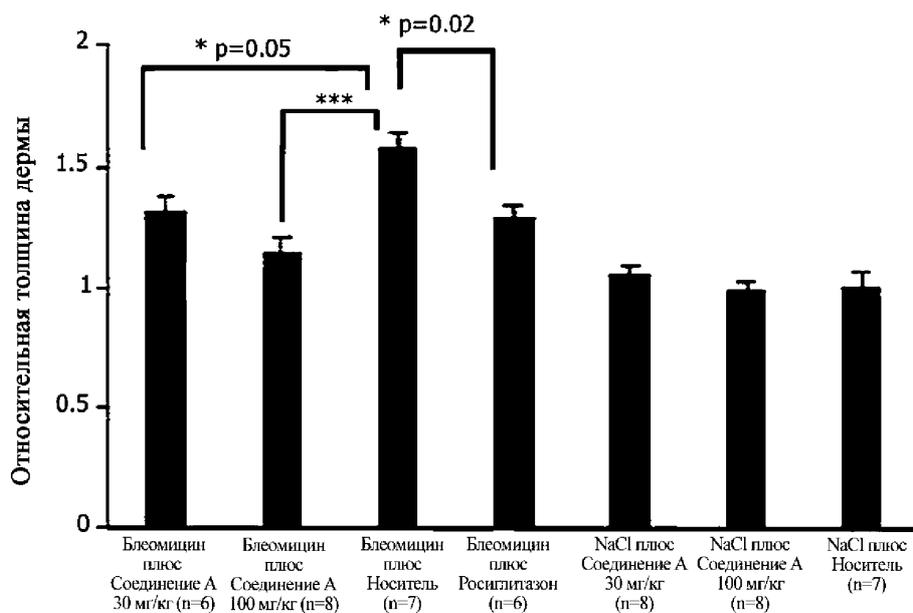


Фиг. 26

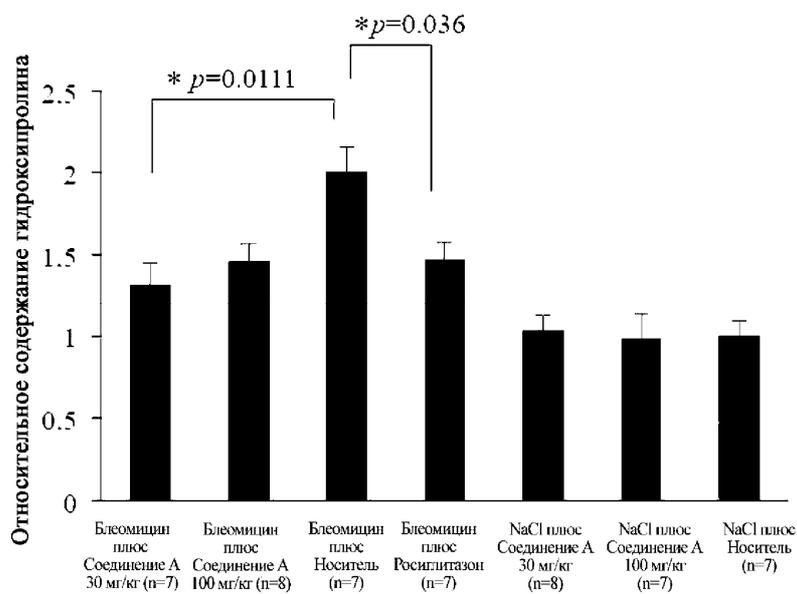


Условные обозначения к фигурам с 17 по 27

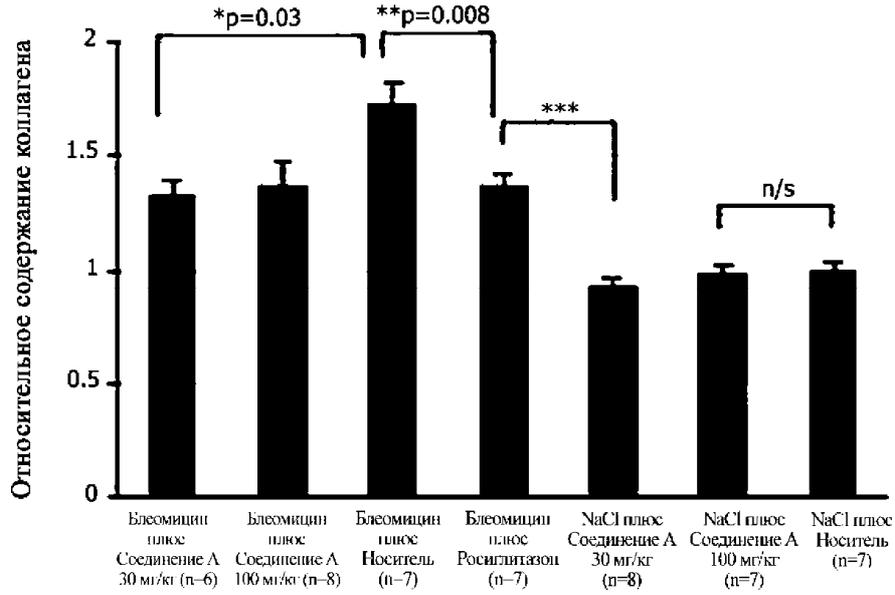
Фиг. 27



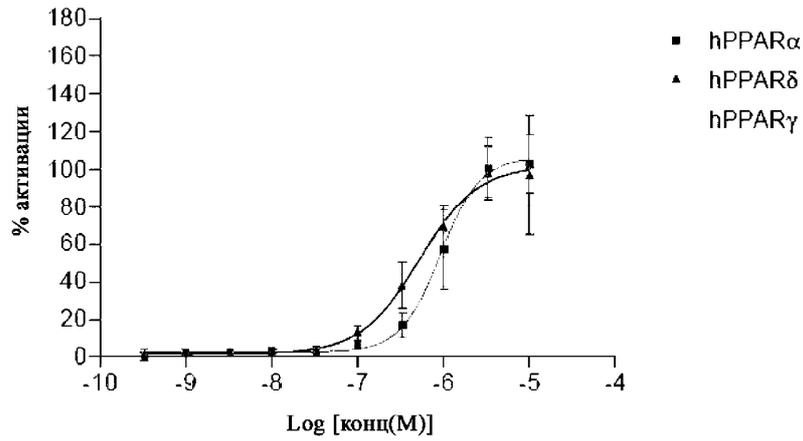
Фиг. 28



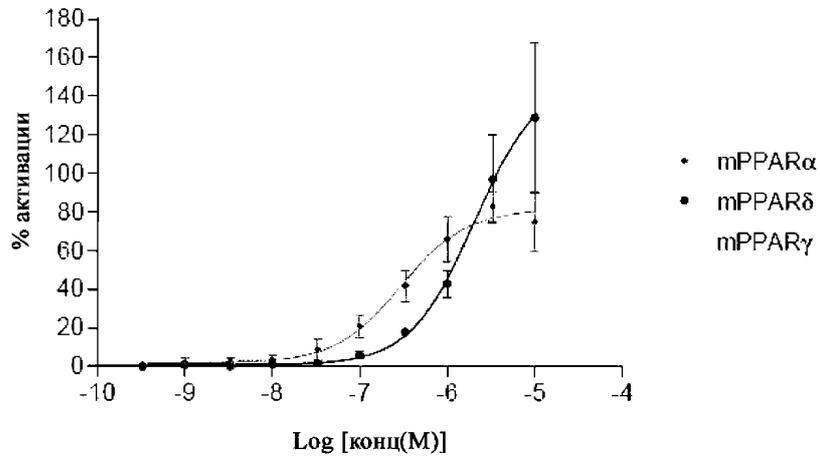
Фиг. 29



Фиг. 30

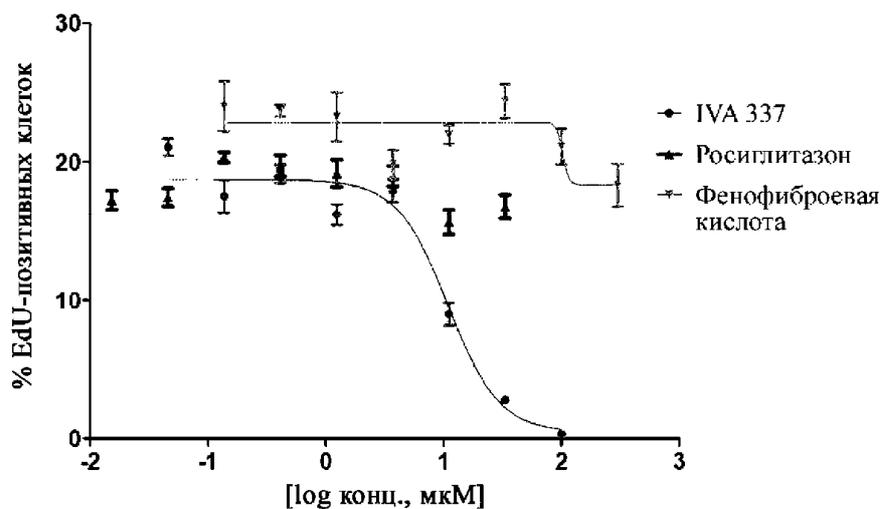


Фиг. 31



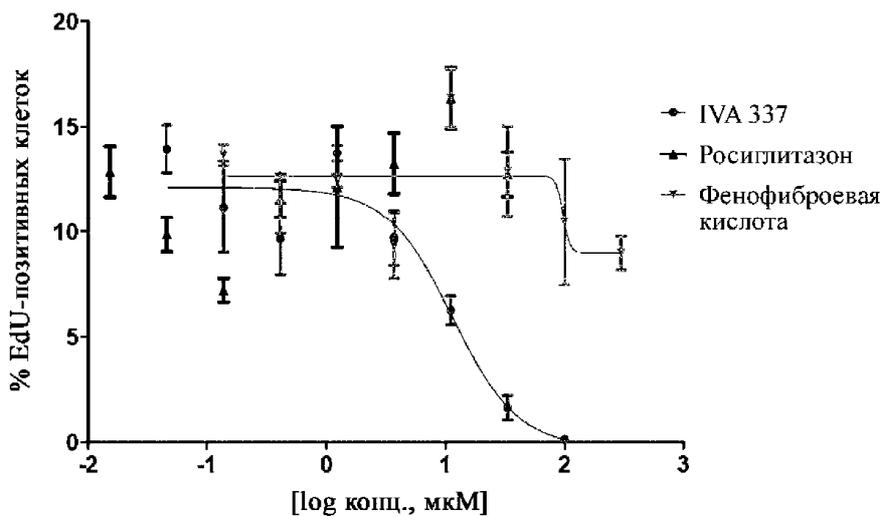
Фиг. 32

Индукцированная PDGF пролиферация
в первичных легочных фибробластах человека



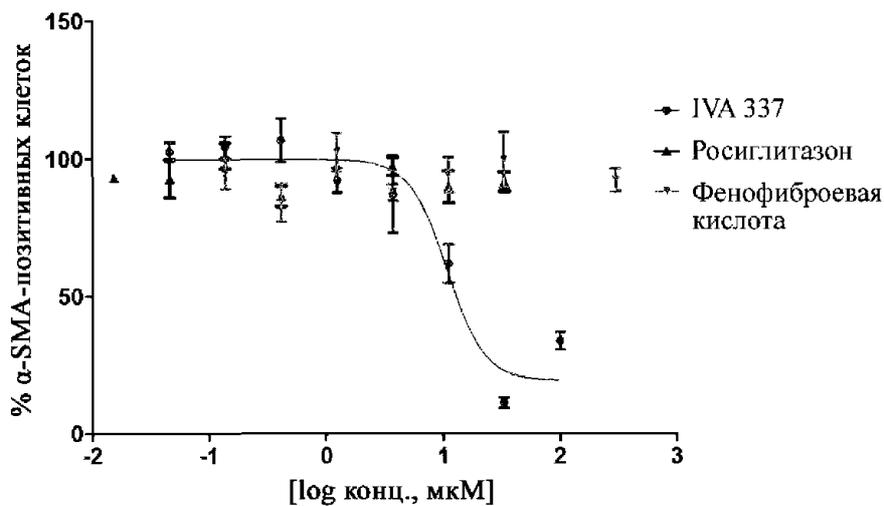
Фиг. 33

Индукцированная PDGF пролиферация
в первичных дермальных фибробластах человека



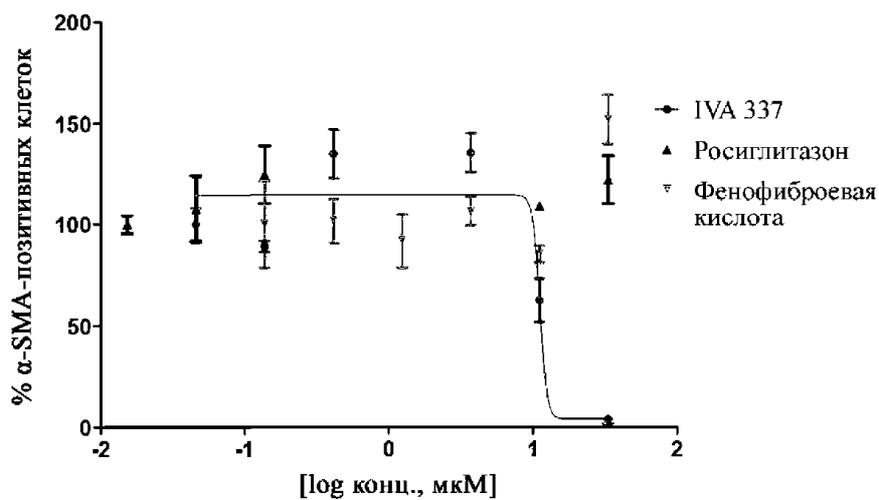
Фиг. 34

Индукцированная TGF β FMT (экспрессия α -SMA)
в первичных легочных фибробластах человека



Фиг. 35

Индукцированная TGF β FMT (экспрессия α -SMA)
в первичных дермальных фибробластах человека



Фиг. 36

