

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036757**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.17

(21) Номер заявки
201792203

(22) Дата подачи заявки
2016.04.06

(51) Int. Cl. *A61K 31/575* (2006.01)
C07J 43/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ**

(31) **62/144,040**

(32) **2015.04.07**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2016/026146**

(87) **WO 2016/164413 2016.10.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕРСЕПТ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Прузански Марк (US), Адорини
Лучано (IT)**

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

(56) WO-A2-2011150286
US-A1-20100056546
WO-A2-2000058293
US-A1-20090105162
WO-A2-2007076260
Shivaprasad et al. "Bromocriptine in type 2 diabetes mellitus" Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. July 2011, vol 15(suppl 1), pg. S17-S24; abstract
US-A1-20140186438
US-A1-20040014734
WO-A1-2012106581

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию агониста FXR и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, которое снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует секрецию инсулина и/или повышает чувствительность к инсулину. Изобретение относится к применению фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованных FXR, таких как NAFLD и NASH, заболевания или состояния, связанных с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину, а именно гипергликемии, диабета, ожирения и инсулинорезистентности, или для уменьшения уровня глюкозы в крови, стимуляции секреции инсулина и/или повышения чувствительности к инсулину.

B1

036757

**036757
B1**

Предпосылки к созданию изобретения

Метаболические нарушения, в том числе сахарный диабет и синдром инсулинорезистентности, характеризуются отклонениями с широким спектром маркеров метаболического риска, таких как гиперинсулинемия, нарушение метаболизма глюкозы, повышенные уровни триглицеридов в плазме крови, уменьшенные уровни холестерина липопротеинов высокой плотности, повышенное кровяное давление и ожирение. Повышенные концентрации глюкозы в крови, уменьшения секреция инсулина и/или увеличенная инсулинорезистентность могут быть вовлечены во многие состояния, в том числе в первичный билиарный цирроз (PBC), первичный склерозирующий холангит (PSC), различные состояния хронического гепатита (гепатит В и С), неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH). Существующие в настоящее время способы лечения направлены либо на инсулинорезистентность (например, метформин, тиазолидиндионы ("TZD")), либо на высвобождение инсулина бета-клетками (например, сульфонилмочевины, эксенатид). Однако данным способам лечения присущи различные недостатки, в том числе побочные эффекты, ограниченная эффективность и нежелательные долгосрочные эффекты.

Желчные кислоты вовлечены в регуляцию различных метаболических процессов и модулируют не только их собственный синтез и кишечно-печеночную рециркуляцию, но и также триглицеридов, холестерина, глюкозы и энергетический гомеостаз. Желчные кислоты также могут играть дополнительную роль в модулировании высвобождения инкретина и в регуляции метаболизма посредством модуляции энергозатрат. Более того, секвестранты желчных кислот (BAS) показали свою роль в лечении различных заболеваний печени, таких как NAFLD и NASH, дисгликемия и сахарный диабет II типа.

Желчные кислоты связываются с ядерным рецептором FXR, который вовлечен в гомеостаз желчных кислот. Это подтверждается тем, что диабет ассоциирован с нарушением регуляции экспрессии FXR. По-видимому, FXR не только играет роль в модификации экспрессии генов, индуцированной углеводами, но также и в синтезе глюкозы в печени во время использования глюкозы в печени после приема пищи и натошак, а также вовлечен в регуляцию сложного набора глюкогенных генов, которые необходимы для предупреждения гипогликемии натошак путем сохранения синтеза глюкозы в печени после приема пищи и накопления гликогена. Кроме того, активация FXR ингибирует индукцию генов, чувствительных к глюкозе, таких как пируваткиназа L-типа (L-PK), после приема пищи.

Таким образом, существуют нереализованные потребности в фармацевтических композициях, содержащих агонисты FXR, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, которое снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует секрецию инсулина и/или повышает чувствительность к инсулину, для лечения или предупреждения различных заболеваний или состояний, ассоциированных с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину. Настоящая заявка соответствует таким требованиям.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы обетихоловой кислоты (OCA) и лираглутида (LIRA), отдельно и в комбинации, в отношении общей NAS. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и $^{\$}p < 0,05$ по сравнению с OCA. Фиг. 1В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении общей NAS. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Фиг. 2А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект от низкой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении компонента NAS, связанного со стеатозом. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и $^{\$}p < 0,05$ по сравнению с OCA. Фиг. 2В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении компонента NAS, связанного со стеатозом. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, $^{\$}p < 0,05$ по сравнению с OCA и $^{\wedge}p < 0,05$ по сравнению с LIRA.

Фиг. 3А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении общего содержания триглицеридов в печени. $^{###}p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW, $^{***}p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH; и $\Delta p < 0,05$ по сравнению с DIO-NASH OCA (10 мг/кг). Фиг. 3В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении общего содержания триглицеридов в печени. $^{###}p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW, $^{**}p < 0,05$ и $^{***}p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH.

Фиг. 4А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении общего содержания холестерина в печени. $^{###}p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW; * $p < 0,05$ и $^{***}p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH. Фиг. 4В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении общего содержания холестерина в печени. $^{###}p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW; $^{**}p < 0,01$ и $^{***}p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH.

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, в отношении веса тела в ходе периода исследования.

Фиг. 6А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и LIRA,

отдельно и в комбинации, на изменения в массе жировой ткани относительно веса тела. Фиг. 6B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и LIRA, отдельно и в комбинации, на изменение в массе ткани относительно веса тела.

На фиг. 7A-7E описан эффект в отношении генов, уникально регулируемых при использовании низких доз OCA и LIRA, отдельно и в комбинации. $*p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 7A представляет собой гистограмму, на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена DFFA-подобного эффектора C, индуцирующего гибель клеток. Фиг. 7B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена ДНК-связывающего белка, содержащего домен смерти. Фиг. 7C представляет собой гистограмму, на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена 2-гидроксиацил-CoA лиаза. Фиг. 7D представляет собой гистограмму на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена лектина, белка, связывающего галактозу. Фиг. 7E представляет собой гистограмму на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена, подобного гену рецептора оксистерол-связывающего белка 3.

На фиг. 8A-8D описан эффект в отношении уровня экспрессии генов, уникально регулируемых при использовании высоких доз OCA и LIRA, отдельно и в комбинации. $*p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой и $\#p < 0,05$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 8A представляет собой гистограмму, на которой показаны эффект в отношении уровня экспрессии гена эстрогенового рецептора 1. Фиг. 8B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии инсулин-индуцируемого гена 2. Фиг. 8C представляет собой гистограмму, на которой показан эффект в отношении уровня экспрессии гена липина 1. Фиг. 8D представляет собой гистограмму, на которой показаны эффект в отношении уровня экспрессии гена шарнирного белка убихинон-цитохром C редуктазы.

Фиг. 9A представляет собой гистограмму, на которой показаны эффект высокой дозы OCA и метформина (MET), отдельно и в комбинации, в отношении общего NAS. $*p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 9B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении компонента NAS, связанного со стеатозом.

Фиг. 10A представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении уменьшения уровня глюкозы с применением OGTT на неделе 4. $\#\#p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW, $\#\#\#p < 0,01$ и $\#\#\#\#p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH, $\Delta\Delta\Delta p < 0,05$ по сравнению с DIO-NASH OCA (10 мг/кг) и $\uparrow\uparrow p < 0,05$ по сравнению с DIO-NASH MET (50 мг/кг). Фиг. 10B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении уменьшения уровня глюкозы с применением OGTT на неделе 4. $\#\#p < 0,001$ по сравнению со средой LEAN-CHOW, $*p < 0,05$, $\#\#\#p < 0,001$ по сравнению со средой DIO-NASH; и $\Delta p < 0,005$, $\Delta\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ по сравнению с DIO-NASH OCA (30 мг/кг).

Фиг. 11 представляет собой гистограмму, на которой показан ряд генов, регулируемых при использовании низких и высоких доз OCA и MET, отдельно и в комбинации.

Фиг. 12A представляет собой диаграмму Венна, на которой показан эффект низкой дозы OCA и метформина, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии генов. Фиг. 12B представляет собой диаграмму Венна, на которой показан эффект высокой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии генов. Фиг. 12C представляет собой диаграмму Венна для сравнения ряда генов, регулируемых при использовании низких и высоких доз OCA и MET.

Фиг. 13A представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена 6a2 типа. Фиг. 13B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена 4a2 типа. Фиг. 13C представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена 5a1 типа.

На фи. 14A-14F описан эффект в отношении уровня экспрессии определенных генов, уникально регулируемых при использовании низких доз OCA и MET, отдельно и в комбинации. $*p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 14A представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена декорина. Фиг. 14B представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена субъединицы 1 ламанина. Фиг. 14C представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена фактора 2 дифференцировки моноцитов в макрофаги. Фиг. 14D представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК транскрипта гена трансформирующего фактора роста В1. Фиг. 14E представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высокой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена рецептора суперсемейства фактора некроза опухолей, представителя 11b. Фиг. 14F представляет собой гистограмму, на которой показаны эффект низкой дозы OCA и MET, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена рецептора суперсемейства фактора некроза опухолей, представителя 19.

На фиг. 15А-15С описан эффект в отношении уровня экспрессии определенных генов коллагена, регулируемых при использовании высоких доз ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации. * $p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 15А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высоких доз ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена 14а1 типа. Фиг. 15В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высоких доз ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена ба1 типа. Фиг. 15С представляет собой гистограмму, на которой показан эффект высоких доз ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена коллагена типа ба2.

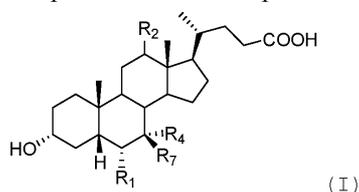
На фиг. 16А-16Е описан эффект в отношении уровня экспрессии определенных генов, уникально регулируемых при использовании высокой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, * $p < 0,005$ по сравнению с контрольной средой. Фиг. 16А представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена бета-формы рецептора фактора роста тромбоцитов. Фиг. 16В представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена декорина. Фиг. 16С представляет собой гистограмму, на которой показаны эффект низкой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена подсемейства коллектинов, представителя 10. Фиг. 16D представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии гена рецептора III трансформирующего фактора роста бета. Фиг. 16Е представляет собой гистограмму, на которой показан эффект низкой дозы ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации, в отношении экспрессии мРНК гена трансформирующего фактора роста, бета-индуцированного.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (i) первое соединение, (ii) по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и (iii) необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение представляет собой агонист FXR, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует секрецию инсулина и/или повышает чувствительность к инсулину.

Настоящая заявка также относится к применению в терапии фармацевтических композиций по настоящей заявке.

В одном варианте осуществления первое соединение представляет собой соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, где R₁, R₂, R₄ и R₇ определены в данном документе.

Настоящая заявка также относится к способам лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованных FXR, и/или заболевания или состояния, связанных с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном варианте осуществления заболевание или состояние, опосредованное FXR, лечат путем активации FXR.

Настоящая заявка также относится к способам лечения или предупреждения неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) или неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящая заявка также относится к способам снижения уровня глюкозы в крови, стимуляции секреции инсулина и/или повышения чувствительности к инсулину, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящая заявка также относится к способам лечения или предупреждения гипергликемии, сахарного диабета или ожирения, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту.

Настоящая заявка также относится к применению фармацевтической композиции по настоящей заявке для снижения уровня глюкозы в крови, стимуляции секреции инсулина, повышения чувствительности к инсулину, лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованных FXR, и/или заболевания или состояния, связанных с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину, и/или для лечения или предупреждения NAFLD, NASH, гипергликемии, сахарного диабета или ожирения. В одном варианте осуществления за-

болевание или состояние лечат путем активации FXR.

Настоящая заявка также относится к применению фармацевтической композиции по настоящей заявке в производстве лекарственного препарата для снижения уровня глюкозы в крови, стимуляции секреции инсулина, повышения чувствительности к инсулину, лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованных FXR, и/или заболевания или состояния, связанных с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину, и/или для лечения или предупреждения NAFLD, NASH, гипергликемии, сахарного диабета или ожирения. В одном варианте осуществления заболевание или состояние лечат путем активации FXR.

Композиции и способы по настоящей заявке направлены на нереализованные потребности в лечении или предупреждении заболевания или нарушения, характеризующегося повышенными концентрациями глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину.

Подробное описание изобретения

Настоящая заявка направлена на фармацевтическую композицию, содержащую (i) первое соединение, (ii) по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и (iii) необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение представляет собой агонист FXR, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует секрецию инсулина и/или повышает чувствительность к инсулину.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое повышает секрецию инсулина. В другом примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое повышает чувствительность клеток-мишеней, тканей или органов к инсулину. В другом примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое уменьшает уровень глюкозы в крови.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой инсулин или аналог инсулина. В дополнительном примере инсулин или аналог инсулина выбран из Humulin® R, инсулина лизпро (Humalog®), инсулина аспарта (Novolog®), инсулина глулизина (Apidra®), инсулин-цинка быстрого действия (Semilente®), инсулина гларгина (Lantus®), инсулина детемира (Levemir®), изофан-инсулина, инсулин-цинка (Lente®), инсулин-цинка длительного действия (Ultralente®), инсулина деглудека, Exubera® и Afrezza®.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор АТФ-чувствительного K⁺ канала в бета-клетках поджелудочной железы. В дополнительном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой сульфонилмочевину. В дополнительном примере сульфонилмочевина выбрана из толбутамида (Orinase®), ацетогексамида (Dymelor), толазамида (Tolinase®), хлорпропамида (Diabinese®), карбутамида (Glucidoral®), метаксамида, глипизида (Glucotrol®), глибурида или глибенкламида (Micronase®), гликопирамида, гликвидона (Glurenorm), гликлазида (Uni Diamicron), глиборнурида, глизоксепида, глимепирида (Amaryl®) и JB253 (Broichhagen et al., Nature Comm. 5, Article No. 5116 (2014)). В другом дополнительном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство выбрано из меглитинида, репаглинида (Prandin®), натеглинида (Starlix®), митиглинида и линоглирида.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой агонист FFA1/ GPR40 (рецептор свободных жирных кислот 1). В дополнительном примере агонист FFA1/ GPR40 представляет собой фазиглифам.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой миметик инкретина. В дополнительном примере миметик инкретина представляет собой глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) или агонист рецептора GLP-1. В дополнительном примере агонист рецептора GLP-1 выбран из эксенатида/эксендина-4, лираглутида, таспоглутида, ликсисенатида, албиглутида, дулаглутида, семаглутида, BRX-0585 (Pfizer/Biorexis) и CJC-1134-PC (эксендина-4, конъюгированного с альбумином человека). В другом дополнительном примере миметик инкретина представляет собой желудочный ингибиторный пептид (GIP) или аналог GIP.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4, также известный из уровня техники как DPP-IV). В дополнительном примере ингибитор DPP-4 выбран из вилдаглиптина (Galvus®), ситаглиптина (Januvia®), саксаглиптина (Onglyza®), линаглиптина (Tradjenta®), алоглиптина, септаглиптина, анаглиптина, гемиглиптина, теналиглиптина, кармеглиптина, гогоглиптина, дутоглиптина, берберина и лупеола.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой агонист гамма-рецептора человека, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR). В дополнительном примере агонист гамма-PPAR выбран из тиазолидиндионов и глитазонов, например, росиглитазона, троглитазона, пиоглитазона, энглитазона, балаглитазона, ривоглитазона, сиглитазона, лобеглитазона и нетоглитазона.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет

собой бигуанид. В дополнительном примере бигуанид выбран из метформина, буформина и фенформина.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой секвестрант желчных кислот. В дополнительном примере секвестрант желчных кислот выбран из анионообменной смолы, четвертичных аммониевых соединений (например, холестирамина или колести-пола) и ингибитора транспорта желчных кислот в подвздошной кишке.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое облегчает метаболизм глюкозы (например, фосфорилирование глюкозы). В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой активатор глюкокиназы. В дополнительном примере активатор глюкокиназы представляет собой соединение, описанное в WO 2000/058293.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое блокирует ренальную реабсорбцию глюкозы. В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор SGLT-2. В дополнительном примере ингибитор SGLT-2 выбран из канаглифлозина, дапаглифлозина, эмпаглифлозина, ремоглифлозина, серглифлозина, тофоглифлозина, ипраглифлозина и эртуглифлозина.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое уменьшает абсорбцию глюкозы в кишечнике. В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор альфа-глюкозидазы. В дополнительном примере ингибитор альфа-глюкозидазы выбран из миглитола (Glyset®), акарбозы (Preco-*se*®) и воглибозы.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое замедляет эвакуацию желудочного содержимого из желудка и/или подавляет глюкагон. В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой амилин или аналог амилина. В дополнительном примере аналог амилина представляет собой прамлинтид.

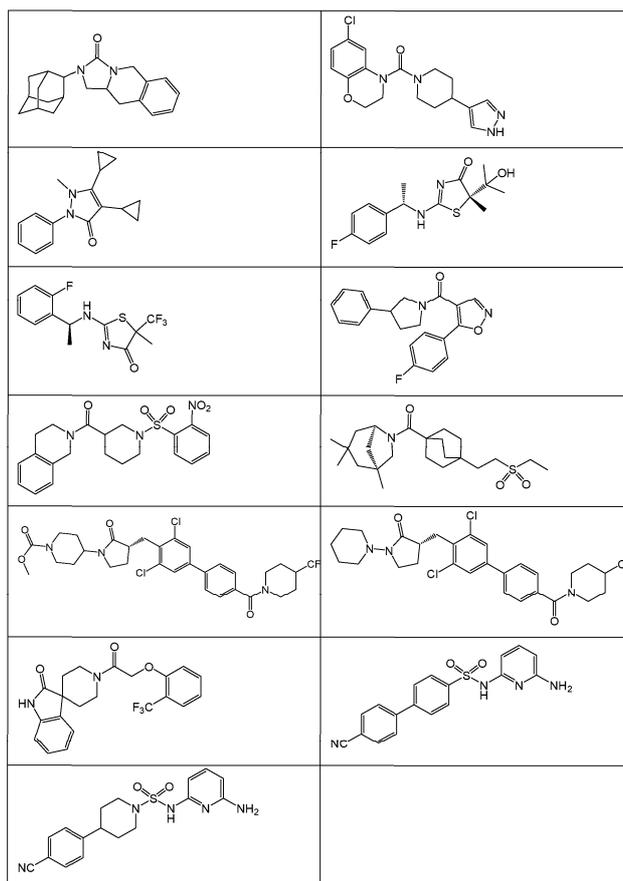
В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP). В дополнительном примере ингибитор MTP выбран из мидаглизола, изаглидола, дериглидола, идазоксана, эфароксана и флупароксана.

В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство выбрано из бромокриптина, бенфлуорекса и толрестата.

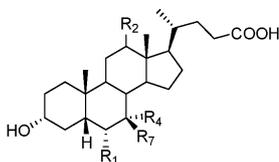
В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое снижает концентрацию глюкокортикоидов. В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор Ибета-HSD1. В дополнительном примере ингибитор Ибета-HSD1 выбран из глицирризиновой кислоты, глицирретиновой кислоты (эноксолон), карбенексолон, абиетиновой кислоты, флавоноида нарингенина, антрахинона эмодаина, адамантил[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепина, BVT-2733, BVT-116429, BVT-3498/AMГ-311, AMГ-221, PF-915275, HSD-016, INCB-13739, INCB-20817, МК-0916, МК-0736, AZD-4017, AZD-8329, RG-4929, RG-7234, BMS-816336, и JTT-654,

BVT-2733	
BVT-116429	
BVT-3498/AMG-311	
AMG-221	
PF-915275	
HSD-016	
INCB-13739	
AZD-4017	
AZD-8329	

при этом соединение выбрано из таблицы ниже:



В одном примере первое соединение фармацевтической композиции представляет собой соединения формулы I



или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, где

R_1 представляет собой водород или незамещенный C_1 - C_6 алкил;

R_2 представляет собой водород или α -гидроксил;

R_4 представляет собой гидроксил или водород, и

R_7 представляет собой гидроксил или водород.

В одном примере R_1 представляет собой незамещенный C_1 - C_6 алкил. В дополнительном примере R_1 представляет собой незамещенный C_1 - C_3 алкил. В дополнительном примере R_1 представляет собой метил, этил или пропил. В дополнительном примере R_1 представляет собой этил.

В одном примере R_2 представляет собой водород. В другом примере R_2 представляет собой α -гидроксил.

В одном примере R_4 представляет собой гидроксил, а R_7 представляет собой водород. В другом примере R_4 представляет собой водород, а R_7 представляет собой гидроксил.

В дополнительном примере R_1 выбран из метила, этила и пропила, R_4 представляет собой гидроксил, R_7 представляет собой водород, а R_2 представляет собой водород. В дополнительном примере R_1 представляет собой этил.

В дополнительном примере R_1 выбран из метила, этила и пропила, R_4 представляет собой водород, R_7 представляет собой гидроксил, а R_2 представляет собой водород. В дополнительном примере R_1 представляет собой этил.

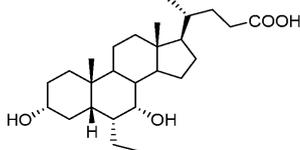
В дополнительном примере R_1 выбран из метила, этила и пропила, R_4 представляет собой гидроксил, R_7 представляет собой водород, а R_2 представляет собой α -гидроксил. В дополнительном примере R_1 представляет собой этил.

В дополнительном примере R_1 выбран из метила, этила и пропила, R_4 представляет собой водород, R_7 представляет собой гидроксил, а R_2 представляет собой α -гидроксил. В дополнительном примере R_1 представляет собой этил.

В одном примере конъюгат с аминокислотой представляет собой конъюгат с глицином. В одном

примере конъюгат с аминокислотой представляет собой конъюгат с таурином.

В дополнительном примере соединение представляет собой



(1)

или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой.

Одной из задач, решаемых с помощью настоящей заявки, является идентификация средств комбинированной терапии для лечения или предупреждения состояний, связанных с повышенной концентрацией глюкозы в крови, таких как заболевания, опосредованные FXR (например, NAFLD и NASH), гипергликемия и диабет, а также для снижения уровня глюкозы в крови, повышения секреции инсулина и повышения чувствительности к инсулину. Например, в настоящей заявке определяют средства комбинированной терапии для лечения или предупреждения заболеваний, опосредованных FXR (например, NAFLD и NASH), посредством уменьшения уровня глюкозы в крови и/или повышения секреции инсулина и/или чувствительности к инсулину. В одном варианте осуществления заболевание или состояние лечат путем активации FXR. Хотя лекарственные средства для состояний, связанных с повышенным уровнем глюкозы, являются доступными, эти лекарственные средства часто не подходят для многих пациентов по ряду причин. Например, многие лекарственные средства оказывают нежелательные эффекты, такие как тошнота, рвота, диарея, головокружение, головная боль и слабость. Некоторые лекарственные средства могут быть неэффективными в лечении в случае введения по отдельности. Например, в некоторых случаях одно средство, стимулирующее секрецию инсулина, сам по себе является неэффективным в осуществлении контроля гипергликемии тяжелой степени, которая присутствует у многих пациентов (например, у пациентов с NAFLD или NASH). Для некоторых лекарственных средств может потребоваться введение высоких доз или более частое введение вследствие экстенсивного метаболизма до неактивных или менее активных метаболитов. Несколько классов терапевтических средств, в том числе лираглутид, вводят путем инъекции. Преимущество перорального совместного введения второго терапевтического средства может приводить к уменьшенному количеству и/или частоте инъекций. При уменьшении количества и/или частоты терапевтический режим дозирования может обеспечивать более высокий уровень приверженности пациента к лечению, особенно пациентов с NASH, которые не могут привыкнуть к инъекциям. С помощью средств комбинированной терапии, описанных в данном документе, можно решить вышеупомянутые задачи, и при этом они могут обладать одним или несколькими преимуществами, заключающимися, например, в синергизме, снижении количества суточных доз без потери эффективности лекарственного средства, снижении уровня глюкозы в крови пациентов, улучшении активности, селективности, проникновения в ткани, периода полувыведения и/или метаболической стабильности.

В композициях, упаковках или наборах, способах и путях применения настоящей заявки первое соединение может представлять собой свободную кислоту или оно может представлять собой фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой (например, конъюгат с глицином или таурином). В одном примере первое соединение представляет собой любой агонист FXR. В одном аспекте первое соединение представляет собой соединение формулы I. В одном аспекте первое соединение представляет собой обетихоловую кислоту (соединение I). В одном примере первое соединение представляет собой свободную кислоту соединения формулы I. В одном примере первое соединение представляет собой конъюгат с глицином соединения формулы I. В одном примере первое соединение представляет собой конъюгат с таурином соединения формулы I.

В композициях, упаковках или наборах, способах и путях применения по настоящей заявке по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое средство, описанное в данном документе. В одном примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое повышает секрецию инсулина. В другом примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое повышает чувствительность клеток-мишеней, тканей или органов к инсулину. В другом примере по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство, которое уменьшает уровень глюкозы в крови.

Соединения по настоящей заявке также охватывают меченное изотопом первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, которые имеют структуру, идентичную структуре первого соединения по настоящей заявке (например, соединение формулы I), за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличные от чаще всего встречающихся в природе атомной массы или массового числа. Примеры изотопов, которые могут быть включены в структуру первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, включают изотопы водорода, углерода, азота, фтора, такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C и ^{18}F .

Первое соединение или его фармацевтически приемлемая соль или конъюгат с аминокислотой, ко-

торые содержат вышеуказанные изотопы и/или другие изотопы других атомов, входят в объем настоящей заявки. Изотопно меченное первое соединение или его фармацевтически приемлемая соль или конъюгат с аминокислотой, например, первое соединение, в структуру которого включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и/или ^{14}C , являются применимыми в анализах распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Изотопы тритий, т. е. ^3H , и углерод-14, т. е. ^{14}C , используют ввиду простоты их получения и выявления. Кроме того, замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т. е., ^2H , может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью, например, увеличенным периодом полувыведения *in vivo* или снижением требуемых доз, и, следовательно, может применяться при определенных условиях. Изотопно меченное первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, как правило, можно получить путем осуществления процедур, раскрытых на схемах и/или в примерах настоящей заявки, посредством замены не меченного изотопами реагента легкодоступным изотопно меченным реагентом. В одном примере обетихоловая кислота или ее фармацевтически приемлемые соли или конъюгаты с аминокислотами не являются изотопно меченными.

В настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, опосредованные FXR. Примеры заболеваний или состояний, опосредованных FXR, включают без ограничения заболевание печени, а именно холестатические или нехолестатические заболевание или состояние печени. В одном варианте осуществления заболевание или состояние, опосредованное FXR, связано с активацией FXR. Холестатические заболевания печени включают без ограничения первичный билиарный цирроз (PBC), первичный склерозирующий холангит (PSC), портальную гипертензию, билиарную атрезию, хологенную диарею, поражение печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброз печени и хроническую печеночную недостаточность. Нехолестатические заболевания или состояния печени включают без ограничения неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), инфекцию вирусом гепатита С, алкогольную болезнь печени, поражение печени вследствие прогрессирующего фиброза, формы рака печени, желудочно-кишечного тракта и желчевыводящих путей, а именно гепатоцеллюлярную карциному, формы рака желчных путей, рак ободочной и прямой кишки, формы рака желудка и формы рака почек, фиброз печени, заболевания печени, индуцированные метотрексатом, изониазидом, оксифенистатином, метилдопой, хлорпромазином, толбутамидом или амиодароном; аутоиммунный гепатит; саркоидоз; болезнь Вильсона; гемохроматоз; болезнь Гоше; болезни накопления гликогена III, IV, VI, IX и X-типов; дефицит $\alpha 1$ -антитрипсина, синдром Цельвегера; тирозинемия; фруктоземия; галактоземия; сосудистое расстройство, ассоциированное с синдромом Бадда-Киари, веноокклюзионной болезнью или тромбозом воротной вены, и врожденный фиброз печени. Примеры заболеваний или состояний, поддающихся лечению посредством активации FXR, также включают гипергликемию, диабет, ожирение, инсулинорезистентность, гиперлипидемию, высокий уровень холестерина LDL, высокий уровень холестерина HDL, высокий уровень триглицеридов и сердечно-сосудистое заболевание.

NAFLD представляет собой медицинское состояние, которое характеризуется накоплением жира (называемым жировой инфильтрацией) в печени. NAFLD является одной из наиболее распространенных причин хронической печеночной недостаточности и охватывает спектр состояний, ассоциированных с отложением липидов в гепатоцитах. Она охватывает диапазон от стеатоза (простой жировой болезни печени) до неалкогольного стеатогепатита (NASH) и выраженного фиброза и цирроза. Данное заболевание является в большинстве случаев бессимптомным и часто обнаруживается случайно по повышенным уровням ферментов печени. NAFLD в значительной степени ассоциирована с ожирением и инсулинорезистентностью и в настоящее время многими считается печеночной составляющей метаболического синдрома.

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) представляет собой состояние, которое вызывает воспаление и накопление жировой и фиброзной (рубцовой) ткани в печени. Уровни ферментов печени в крови могут быть повышены в большей степени, чем в случае незначительных повышений, наблюдаемых при неалкогольной жировой болезни печени (NAFL). Хотя аналогичные состояния могут иметь место у людей, которые злоупотребляют алкоголем, NASH возникает у людей, которые употребляют алкоголь в малых количествах или не употребляют его. NASH поражает 2-5 процентов американцев и наиболее часто наблюдается у людей с одним или несколькими из следующих состояний: ожирение, сахарный диабет, гиперлипидемия, инсулинорезистентность, использование определенных медикаментов и воздействие токсинов. NASH становится все более распространенной причиной хронической печеночной недостаточности в мире и ассоциирован с повышенной смертностью, связанной с поражением печени, и гепатоцеллюлярной карциномой, даже при отсутствии цирроза. NASH прогрессирует до цирроза у 15-20% пораженных индивидуумов и в настоящее время является одним из основных показаний для трансплантации печени в США. На сегодняшний день не существует одобренных средств терапии NASH.

В настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения NAFLD или NASH. В

одном примере в настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения NAFLD или NASH, который ассоциирован с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину. В одном примере в настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения NAFLD или NASH по меньшей мере частично посредством уменьшения уровня глюкозы в крови и/или повышения секреции инсулина и/или чувствительности к инсулину. В одном примере в настоящей заявке представлен способ лечения или предупреждения NASH. В одном примере в настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения NASH, который ассоциирован с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину. В одном примере в настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения NASH по меньшей мере частично посредством уменьшения уровня глюкозы в крови и/или повышения секреции инсулина и/или чувствительности к инсулину.

В одном примере болезнь или состояние связано с повышенным уровнем глюкозы в крови, уменьшенной секрецией инсулина и/или уменьшенной чувствительностью к инсулину. Примеры болезни или состояния включают без ограничения заболевания, опосредованные FXR (например, NAFLD и NASH), гипергликемию, диабет, ожирение и инсулинорезистентность.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой заболевание, опосредованное FXR. В одном примере заболевание или состояние представляет собой NAFLD или NASH. В одном примере заболевание или состояние представляют собой NASH.

В одном примере заболевание или состояние представляют собой гипергликемию, диабет, ожирение или инсулинорезистентность. В одном примере заболевание или состояние представляют собой гипергликемию. В одном примере заболевание или состояние представляют собой диабет. В дополнительном примере диабет представляет собой диабет I типа. В другом дополнительном примере диабет представляет собой диабет II типа. В одном примере заболевание или состояние представляют собой ожирение. В одном примере заболевание или состояние представляют собой инсулинорезистентность.

В настоящей заявке также представлен способ лечения или предупреждения гипергликемии, диабета, ожирения или инсулинорезистентности, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере субъект не страдает от холестатического состояния. В другом примере субъект страдает от холестатического состояния. В одном примере субъект не страдает от заболевания печени. В другом примере субъект страдает от заболевания печени. В дополнительном примере заболевание печени выбрано из холестатического заболевания печени, а именно PBC, PSC, портальной гипертензии, хологенной диареи, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброза печени и хронической печеночной недостаточности. В дополнительном примере субъект страдает от PBC, NAFLD или NASH. В дополнительном примере субъект страдает от фиброза. В другом дополнительном примере субъект страдает от нехолестатического заболевания или состояния печени, а именно неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), инфекции вирусом гепатита C, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, форм рака печени, желудочно-кишечного тракта и желчевыводящих путей, а именно гепатоцеллюлярной карциномы, форм рака желчных путей, рака ободочной и прямой кишки, форм рака желудка и форм рака почек, фиброза печени, заболеваний печени, индуцированных оксифенистатином, метилдопой, хлорпромазином, толбутамидом или амиодароном; аутоиммунного гепатита; саркоидоза; болезни Вильсона; гемохроматоза; болезни Гоше; болезней накопления гликогена III, IV, VI, IX и X-типов, дефицита α 1-антитрипсина, синдрома Целльвегера; тирозинемии; фруктоземии; галактоземии; сосудистого расстройства, ассоциированного с синдромом Бадда-Киари, веноокклюзионным заболеванием или тромбозом воротной вены; и врожденного фиброза печени.

В настоящей заявке также представлен способ снижения уровня глюкозы в крови, стимуляции секреции инсулина и/или увеличения чувствительности к инсулину, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере субъект не страдает от холестатического состояния. В другом примере субъект страдает от холестатического состояния. В одном примере субъект не страдает от заболевания печени. В другом примере субъект страдает от заболевания печени. В дополнительном примере заболевание печени выбрано из холестатической болезни печени, а именно PBC, PSC, портальной гипертензии, хологенной диареи, хронической печеночной недостаточности, NAFLD, NASH, инфекции вирусом гепатита C, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброза печени и хронической печеночной недостаточности. В дополнительном примере субъект страдает от PBC, NAFLD или NASH. В другом дополнительном примере субъект страдает от фиброза. В другом примере субъект страдает от нехолестатической болезни или состояния печени, а именно неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), инфицирования гепатитом C, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, форм рака печени, желудочно-кишечного тракта и желчевыводящих путей, а именно гепатоцеллюлярной карциномы, форм рака желчного протока, рака ободочной и прямой кишки, форм рака желудка и форм рака почек, фиброза

печени, болезней печени, индуцированных оксифенистатином, метилдопой, хлорпромазином, толбутамидом или амиодароном; аутоиммунного гепатита; саркоидоза; болезни Вильсона; гемохроматоза; болезни Гоше; болезней накопления гликогена III, IV, VI, IX и X-типов, дефицита α 1-антитрипсина, синдрома Цельвегера; тирозинемии; фруктоземии; галактоземии; сосудистого расстройства, ассоциированного с синдромом Бадда-Киари, веноокклюзионной болезнью или тромбофлебитом воротной вены; и врожденного фиброза печени.

В настоящей заявке также представлен способ ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере субъект не страдает от холестатического состояния. В другом примере субъект страдает от холестатического состояния.

В одном примере субъект, которому вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции по настоящей заявке, не страдает от холестатического состояния, ассоциированного с заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из первичного рака печени и желчевыводящих путей, а именно гепатоцеллюлярной карциномы, рака ободочной и прямой кишки, метастатического рака, сепсиса, хронического полного парентерального питания, муковисцидоза и гранулематозной болезни печени. В одном примере фиброз, подлежащий ингибированию или регрессии, имеет место в органе, в котором экспрессируется FXR.

В одном примере холестатическое состояние определено как аномально повышенный в сыворотке крови уровень щелочной фосфатазы, γ -глутамилтранспептидазы (GGT) и/или 5'-нуклеотидазы. В другом примере холестатическое состояние дополнительно определено как проявляющееся в виде по меньшей мере одного клинического симптома. В одном примере симптом представляет собой чесотку (зуд). В другом примере холестатическое состояние выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного цирроза (PBC), первичного склерозирующего холангита (PBS), холестаза, индуцированного лекарственными средствами, наследственного холестаза и внутривнутрипеченочного холестаза беременных.

В одном примере фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза печени, фиброза почки и фиброза кишечника.

В одном примере у субъекта, которому вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции по настоящей заявке, имеется фиброз печени, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из гепатита В; гепатита С; паразитарных болезней печени; посттрансплантационных бактериальных, вирусных и грибковых инфекций; алкогольной болезни печени (ALD); неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); неалкогольного стеатогепатита (NASH); заболеваний печени, индуцированных метотрексатом, изониазидом, оксифенистатином, метилдопой, хлорпромазином, толбутамидом или амиодароном; аутоиммунного гепатита; саркоидоза; болезни Вильсона; гемохроматоза; болезни Гоше; болезней накопления гликогена III, IV, VI, IX и X типов; дефицита α 1-антитрипсина; синдрома Цельвегера; тирозинемии; фруктоземии; галактоземии; сосудистого расстройства, ассоциированного с синдромом Бадда-Киари, веноокклюзионной болезнью или тромбофлебитом воротной вены; и врожденного фиброза печени.

В другом примере у субъекта имеется фиброз кишечника, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из болезни Крона, неспецифического язвенного колита, лучевого колита и микроскопического колита.

В другом примере у субъекта имеется ренальный фиброз, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из диабетической нефропатии, гипертонического нефросклероза, хронического гломерулонефрита, хронической посттрансплантационной гломерулопатии, хронического интерстициального нефрита и поликистоза почек.

В другом примере у субъекта, которому вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции по настоящей заявке, имеется фиброз кишечника, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из болезни Крона, неспецифического язвенного колита, лучевого колита и микроскопического колита.

В другом примере у субъекта, которому вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции по настоящей заявке, имеется ренальный фиброз, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из диабетической нефропатии, гипертонического нефросклероза, хронического гломерулонефрита, хронической посттрансплантационной гломерулопатии, хронического интерстициального нефрита и поликистоза почек.

В настоящей заявке также представлен способ снижения количества сывороточного билирубина и/или одного или нескольких ферментов печени, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту.

В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение количества сывороточного билирубина по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеется повышенный уровень билирубина по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые опи-

саны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина до нормального уровня (например, аналогичного уровню билирубина у индивидуума без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина ниже 10 мг/л, 9 мг/л, 8 мг/л, 7 мг/л, 6 мг/л, 5 мг/л, 4 мг/л, 3 мг/л, 2 мг/л, 1,5 мг/л, 1,2 мг/л или 1 мг/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина ниже 2 мг/л, 1,5 мг/л, 1,2 мг/л или 1 мг/л.

В одном примере фермент печени выбран из группы, состоящей из щелочной фосфатазы (ALP, AP или Alk Phos), аланинаминотрансферазы (ALT), аспаратаминотрансферазы (AST), гамма-глутамилтранспептидазы (GGT), лактатдегидрогеназы (LDH) и 5'-нуклеотидазы. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение количества одного или нескольких ферментов печени по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни одного или нескольких ферментов печени по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней одного или нескольких ферментов печени (например, ALP, ALT, AST, GGT, LDH и 5'-нуклеотидазы) до нормальных уровней (например, аналогичных уровням ферментов печени у индивидуума без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе).

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня сывороточного ALP ниже 500 МЕ/л (международных единиц на литр), 400 МЕ/л, 300 МЕ/л, 200 МЕ/л, 180 МЕ/л, 160 МЕ/л или 150 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALP до от приблизительно 40 МЕ/л до приблизительно 150 МЕ/л.

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALT ниже 200 МЕ/л (международных единиц на литр), 150 МЕ/л, 100 МЕ/л, 80 МЕ/л, 60 МЕ/л или 50 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALT до от приблизительно 5 МЕ/л до приблизительно 50 МЕ/л.

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня AST ниже 200 МЕ/л (международных единиц на литр), 150 МЕ/л, 100 МЕ/л, 80 МЕ/л, 60 МЕ/л, 50 МЕ/л, или 40 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня AST до от приблизительно 10 МЕ/л до приблизительно 50 МЕ/л.

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня GGT ниже 200 МЕ/л (международных единиц на литр), 150 МЕ/л, 100 МЕ/л, 90 МЕ/л, 80 МЕ/л, 70 МЕ/л или 60 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня GGT до от приблизительно 15 МЕ/л до приблизительно 50 МЕ/л или от приблизительно 5 МЕ/л до приблизительно 30 МЕ/л.

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня LDH ниже 500 МЕ/л (международных единиц на литр), 400 МЕ/л, 300 МЕ/л, 200 МЕ/л, 180 МЕ/л, 160 МЕ/л, 150 МЕ/л, 140 МЕ/л, или 130 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня LDH до от приблизительно 120 МЕ/л до приблизительно 220 МЕ/л.

В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня 5'-нуклеотидазы ниже 50 МЕ/л (международных единиц на литр), 40 МЕ/л, 30 МЕ/л, 20 МЕ/л, 18 МЕ/л, 17 МЕ/л, 16 МЕ/л, 15 МЕ/л, 14 МЕ/л, 13 МЕ/л, 12 МЕ/л, 11 МЕ/л, 10 МЕ/л, 9 МЕ/л, 8 МЕ/л, 7 МЕ/л, 6 МЕ/л, или 5 МЕ/л. В дополнительном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровня 5'-нуклеотидазы до от приблизительно 2 МЕ/л до приблизительно 15 МЕ/л.

В настоящей заявке также представлен способ снижения уровней глюкозы (например, количества глюкозы), а именно в крови, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере способ обеспечивает снижение уровней глюкозы после приема пищи по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни глюкозы после приема пищи по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ обеспечивает снижение уровней глюкозы натощак по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни глюкозы натощак по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней глюкозы натощак до нормальных уровней (например, аналогичных

уровням глюкозы у индивидуума без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе).

В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни глюкозы по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней глюкозы после приема пищи ниже 800 мг/л, 700 мг/л, 600 мг/л, 500 мг/л, 400 мг/л, 350 мг/л, 300 мг/л, 250 мг/л, 240 мг/л, 230 мг/л, 220 мг/л, 210 мг/л, 200 мг/л, 190 мг/л, 180 мг/л, 170 мг/л, 160 мг/л или 150 мг/л. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней глюкозы после приема пищи ниже 200 мг/л, 190 мг/л, 180 мг/л, 170 мг/л, 160 мг/л, или 150 мг/л. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней глюкозы натощак до 70-800 мг/л, 70-700 мг/л, 70-600 мг/л, 70-500 мг/л, 70-400 мг/л, 70-350 мг/л, 70-300 мг/л, 70-250 мг/л, 70-240 мг/л, 70-230 мг/л, 70-220 мг/л, 70-210 мг/л, 70-200 мг/л, 70-190 мг/л, 70-180 мг/л, 70-170 мг/л, 70-160 мг/л, 70-150 мг/л, 70-140 мг/л, 70-130 мг/л, 70-120 мг/л, 70-110 мг/л, 70-100 мг/л, 70-130 мг/л, 90-120 мг/л, 90-110 мг/л или 90-100 мг/л. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней глюкозы после приема пищи до 70-200 мг/л, 70-190 мг/л, 70-180 мг/л, 70-170 мг/л, 70-160 мг/л, 70-150 мг/л, 70-140 мг/л, 70-130 мг/л, 70-120 мг/л, 70-110 мг/л, 70-100 мг/л, 90-130 мг/л, 90-120 мг/л, 90-110 мг/л или 90-100 мг/л.

В настоящей заявке также представлен способ снижения уровней гемоглобина A1c (HbA1c) (т. е. количества HbA1c), а именно в крови, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере способ обеспечивает снижение уровней HbA1c по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни HbA1c по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней HbA1c до нормальных уровней (например, аналогичных уровням HbA1c у индивидуума без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе).

В одном примере у субъекта имеются повышенные уровни HbA1c по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней HbA1c ниже 10%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,4%, 6,3%, 6,2%, 6,1%, 6,0%, 5,9%, 5,8% или 5,7%. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней HbA1c ниже 8,0%, 7,9%, 7,8%, 7,7%, 7,6%, 7,5%, 7,4%, 7,3%, 7,2%, 7,1%, 7,0%, 6,9%, 6,8%, 6,7%, 6,6%, 6,5%, 6,4%, 6,3%, 6,2%, 6,1%, 6,0%, 5,9%, 5,8% или 5,7%. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает снижение уровней HbA1c ниже 6,5%, 6,4%, 6,3%, 6,2%, 6,1%, 6,0%, 5,9%, 5,8% или 5,7%.

В настоящей заявке также представлен способ повышения секреции инсулина (т. е. количества инсулина), включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает повышение секреции инсулина по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются уменьшенные уровни секреции инсулина по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе). В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает увеличение секреции инсулина таким образом, что уровень инсулина составляет 2-9,0 мМЕ/мл, 2-8,9 мМЕ/мл, 2-8,8 мМЕ/мл, 2-8,7 мМЕ/мл, 2-8,6 мМЕ/мл, 2-8,5 мМЕ/мл, 2-8,4 мМЕ/мл, 2-8,3 мМЕ/мл, 2-8,2 мМЕ/мл, 2-8,1 мМЕ/мл, 2-8,0 мМЕ/мл, 2-7,9 мМЕ/мл, 2-7,8 мМЕ/мл, 2-7,7 мМЕ/мл, 2-7,6 мМЕ/мл, 2-7,5 мМЕ/мл, 2-7,4 мМЕ/мл, 2-7,3 мМЕ/мл, 2-7,2 мМЕ/мл, 2-7,1 мМЕ/мл, 2-7,0 мМЕ/мл, 2-6,9 мМЕ/мл, 2-6,8 мМЕ/мл, 2-6,7 мМЕ/мл, 2-6,6 мМЕ/мл, 2-6,5 мМЕ/мл, 2-6,4 мМЕ/мл, 2-6,3 мМЕ/мл, 2-6,2 мМЕ/мл, 2-6,1 мМЕ/мл, 2-6,0 мМЕ/мл, 3-9,0 мМЕ/мл, 3-8,9 мМЕ/мл, 3-8,8 мМЕ/мл, 3-8,7 мМЕ/мл, 3-8,6 мМЕ/мл, 3-8,5 мМЕ/мл, 3-8,4 мМЕ/мл, 3-8,3 мМЕ/мл, 3-8,2 мМЕ/мл, 3-8,1 мМЕ/мл, 3-8,0 мМЕ/мл, 3-7,9 мМЕ/мл, 3-7,8 мМЕ/мл, 3-7,7 мМЕ/мл, 3-7,6 мМЕ/мл, 3-7,5 мМЕ/мл, 3-7,4 мМЕ/мл, 3-7,3 мМЕ/мл, 3-7,2 мМЕ/мл, 3-7,1 мМЕ/мл, 3-7,0 мМЕ/мл, 3-6,9 мМЕ/мл, 3-6,8 мМЕ/мл, 3-6,7 мМЕ/мл, 3-6,6 мМЕ/мл, 3-6,5 мМЕ/мл, 3-6,4 мМЕ/мл, 3-6,3 мМЕ/мл, 3-6,2 мМЕ/мл, 3-6,1 мМЕ/мл, 3-6,0 мМЕ/мл, 4-9,0 мМЕ/мл, 4-8,9 мМЕ/мл, 4-8,8 мМЕ/мл, 4-8,7 мМЕ/мл, 4-8,6 мМЕ/мл, 4-8,5 мМЕ/мл, 4-8,4 мМЕ/мл, 4-8,3 мМЕ/мл, 4-8,2 мМЕ/мл, 4-8,1 мМЕ/мл, 4-8,0 мМЕ/мл, 4-7,9 мМЕ/мл, 4-7,8 мМЕ/мл, 4-7,7 мМЕ/мл, 4-7,6 мМЕ/мл, 4-7,5 мМЕ/мл, 4-7,4 мМЕ/мл, 4-7,3 мМЕ/мл, 4-7,2 мМЕ/мл, 4-7,1 мМЕ/мл, 4-7,0 мМЕ/мл, 4-6,9 мМЕ/мл, 4-6,8 мМЕ/мл, 4-6,7 мМЕ/мл, 4-6,6 мМЕ/мл, 4-6,5 мМЕ/мл, 4-6,4 мМЕ/мл, 4-6,3 мМЕ/мл, 4-6,2 мМЕ/мл, 4-6,1 мМЕ/мл, 4-6,0 мМЕ/мл, 5-9,0 мМЕ/мл, 5-8,9 мМЕ/мл, 5-8,8 мМЕ/мл, 5-8,7 мМЕ/мл, 5-8,6 мМЕ/мл, 5-8,5 мМЕ/мл, 5-8,4 мМЕ/мл, 5-8,3 мМЕ/мл, 5-8,2 мМЕ/мл, 5-8,1 мМЕ/мл, 5-8,0 мМЕ/мл, 5-7,9 мМЕ/мл, 5-7,8 мМЕ/мл, 5-7,7 мМЕ/мл, 5-7,6 мМЕ/мл, 5-7,5 мМЕ/мл, 5-7,4 мМЕ/мл, 5-7,3 мМЕ/мл, 5-7,2 мМЕ/мл, 5-7,1 мМЕ/мл, 5-7,0 мМЕ/мл, 5-6,9 мМЕ/мл, 5-6,8 мМЕ/мл, 5-6,7 мМЕ/мл, 5-6,6 мМЕ/мл, 5-6,5 мМЕ/мл, 5-6,4 мМЕ/мл, 5-6,3 мМЕ/мл, 5-6,2 мМЕ/мл, 5-6,1 мМЕ/мл или 5-6,0 мМЕ/мл.

В настоящей заявке также представлен способ повышения чувствительности к инсулину (т. е. уменьшения инсулинорезистентности), включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящей заявке нуждающемуся в этом субъекту. В одном примере способ по настоящей заявке обеспечивает повышение чувствительности к инсулину (например, уменьшение инсулинорезистентности) по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с субъектом контрольной группы (например, субъектом, которому не вводили композицию по настоящей заявке). В одном примере у субъекта имеются сниженные уровни чувствительности к инсулину (например, имеется повышенная инсулинорезистентность) по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, а именно таких, которые описаны в данном документе).

Под чувствительностью к инсулину подразумевают, насколько чувствителен организм к эффектам, оказываемым инсулином. Человек, который считается чувствительным к инсулину, будет нуждаться в меньших количествах инсулина для снижения уровней глюкозы в крови, чем кто-либо другой с низкой чувствительностью.

Инсулинорезистентность (IR) представляет собой физиологическое состояние, при котором клетки, ткани или органы не реагируют на действие инсулина в норме. Соответственно, клетки тканей или органов в организме становятся нечувствительными к инсулину и неспособны использовать инсулин так же эффективно, как и нормальные клетки, ткани или органы (например, клетки, ткани или органы здорового субъекта).

В одном примере субъект представляет собой млекопитающее. В одном примере млекопитающее представляет собой человека.

В одном примере первое соединение и одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят в двухкомпонентной комбинации. В другом примере первое соединение и два или более дополнительных терапевтических средств (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе) вводят в двухкомпонентной комбинации.

С помощью первого соединения, вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, дополнительными терапевтическими средствами, описанными в данном документе) можно достигать синергических эффектов, таких как синергическое снижение уровней глюкозы, уровней HbA_{1c} и/или инсулинорезистентности, которые могут быть нечувствительными к отдельным средствам терапии. Следовательно, преимущественной является комбинация первого соединения и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе). Может быть особенно преимущественным, чтобы такая комбинация первого соединения и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе) была представлена в виде одной фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем (как, например, в форме одной капсулы), предназначенной для повышения приверженности к лечению и, следовательно, эффективности. Соответственно, в настоящей заявке дополнительно представлена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество первого соединения и эффективное количество по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе) вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными средствами или наполнителями.

В одном примере первое соединение и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят одновременно. Например, первое соединение и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят вместе в одной фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем. В другом примере первое соединение и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят последовательно. Например, первое соединение вводят до или после по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе).

В одном примере первое соединение вводят в первой дозе в течение первого периода времени с последующим введением первого соединения во второй дозе в течение второго периода времени. В одном примере первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой вводят в общем суточном количестве, составляющем 0,1-1500 мг, 0,2-1200 мг, 0,3-1000 мг, 0,4-800 мг, 0,5-600 мг, 0,6-500 мг, 0,7-400 мг, 0,8-300 мг, 1-200 мг, 1-100 мг, 1-50 мг, 1-30 мг, 4-26 мг или 5-25 мг, в течение первого периода времени с последующим введением второго соединения в общем суточном количестве, составляющем 0,1-1500 мг, 0,2-1200 мг, 0,3-1000 мг, 0,4-800 мг, 0,5-600 мг, 0,6-500 мг, 0,7-400 мг, 0,8-300 мг, 1-200 мг, 1-100 мг, 1-50 мг, 1-30 мг, 4-26 мг или 5-25 мг. В одном примере общее количество вводят перорально один раз в сутки. В одном примере первая доза является отличной от второй до-

зы. В дополнительном примере первая доза является более низкой, чем вторая доза. В другом примере первая доза является более высокой, чем вторая доза. В одном примере первая доза составляет приблизительно 5 мг (например, от 4,8 мг до 5,2 мг), а вторая доза составляет приблизительно 10 мг (например, от 9,8 мг до 10,2 мг). В одном примере первый период времени составляет приблизительно 6 месяцев. В одном примере второй период времени составляет приблизительно 6 месяцев.

В одном примере фармацевтическую композицию вводят перорально, парентерально или наносят местно. В другом примере фармацевтическую композицию вводят перорально.

Композиция в соответствии с настоящей заявкой, как правило, будет содержать достаточное количество первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе) для обеспечения введения необходимой суточной дозы каждого из них нуждающемуся в этом субъекту в одной стандартной лекарственной форме, такой как таблетка или капсула, или в двух или более стандартных лекарственных формах, подлежащих введению одновременно или с интервалами в течение суток.

В способах по настоящей заявке активные вещества можно вводить в одной суточной дозе или в двух, трех, четырех или более идентичных или разных разделенных дозах в сутки, и их можно вводить одновременно или в разное время в течение суток. Обычно активные вещества вводят одновременно, чаще в одной комбинированной лекарственной форме.

В одном аспекте первое соединение и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят в дозах, фактически аналогичных дозам, в которых их вводят в соответствующих режимах монотерапии. В одном аспекте первое соединение вводят в дозе, которая меньше, чем его доза в режиме монотерапии (например, составляющей менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%). В одном аспекте по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят в дозе, которая меньше, чем его доза в режиме монотерапии (например, менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%). В одном аспекте и первое соединение, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) вводят в дозах, которые меньше, чем их соответствующие дозы в режиме монотерапии (например, менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%).

Фармацевтическая композиция настоящей заявки может быть представлена в любой удобной форме для перорального введения, в такой как таблетка, капсула, порошок, лепешка, пилюля, пастилка, эликсир, лиофилизированный порошок, раствор, гранула, суспензия, эмульсия, сироп или настойка. Формы с медленным высвобождением или отсроченным высвобождением также можно получить, например, в форме покрытых частиц, многослойных таблеток, капсул, заключенных в капсулы, таблеток, заключенных в капсулы, или микрогранул.

Твердые формы для перорального введения могут содержать фармацевтически приемлемые связующие вещества, подсластители, разрыхлители, разбавители, ароматизирующие средства, покрывающие средства, консерванты, смазывающие вещества и/или средства, отсрочивающие высвобождение. Подходящие связующие вещества включают арабийскую камедь, желатин, кукурузный крахмал, трагакантовую камедь, альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу или полиэтиленгликоль. Подходящие подсластители включают сахарозу, лактозу, глюкозу, аспартам или сахарин. Подходящие разрыхлители включают кукурузный крахмал, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, ксантановую камедь, бентонит, альгиновую кислоту или агар. Подходящие разбавители включают лактозу, сорбит, маннит, декстрозу, каолин, целлюлозу, карбонат кальция, силикат кальция или фосфат дикальция. Подходящие ароматизирующие средства включают масло мяты перечной, масло грушанки, вишневым, апельсиновым или малиновым ароматизатор. Подходящие покрывающие средства включают полимеры или сополимеры акриловой кислоты и/или метакриловой кислоты и/или их сложные эфиры, воски, жирные спирты, зеин, шеллак или глютен. Подходящие консерванты включают бензоат натрия, витамин Е, альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, метилпарабен, пропилпарабен или бисульфит натрия. Подходящие смазывающие вещества включают стеарат магния, стеариновую кислоту, олеат натрия, хлорид натрия или тальк. Подходящие средства, отсрочивающие высвобождение, включают глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат.

Жидкие формы для перорального введения могут содержать, в дополнение к вышеуказанным средствам, жидкий носитель. Подходящие жидкие носители включают воду, масла, такие как оливковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, масло земляного ореха, кокосовое масло, жидкий парафин, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, этанол, пропанол, изопропанол, глицерин, жирные спирты, триглицериды или их смеси.

Суспензии для перорального введения могут дополнительно содержать диспергирующие средства и/или суспендирующие средства. Подходящие суспендирующие средства включают натрий карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, альгинат на-

трия или цетиловый спирт. Подходящие диспергирующие средства включают лецитин, сложные эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, таких как стеариновая кислота, полиоксиэтиленсорбитмоно- или диолеат, -стеарат или -лаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоно- или диолеат, -стеарат или -лаурат и т. п.

Эмульсии для перорального введения могут дополнительно содержать одно или несколько эмульгирующих средств. Подходящие эмульгирующие средства включают диспергирующие средства, приведенные в качестве примера выше, или природные камеди, такие как аравийская камедь или трагакантовая камедь.

Фармацевтические композиции по настоящей заявке можно получить посредством сухого смешивания, измельчения, гомогенизации, суспендирования, растворения, эмульгирования, диспергирования и/или смешивания первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства вместе с выбранными наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным средством (вспомогательными средствами) и/или разбавителем (разбавителями). Один тип фармацевтической композиции по настоящей заявке в форме таблетки или капсулы можно получить посредством (а) получения первой таблетки, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вместе с любыми требуемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным средством (вспомогательными средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (b) получения второй таблетки или капсулы, где вторая таблетка или капсула содержит остальное количество активного (активных) вещества (веществ) и первую таблетку. Другой тип фармацевтической композиции по настоящей заявке в форме капсулы можно получить посредством (а) получения первой капсулы, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, и дополнительное (дополнительные) терапевтическое средство (терапевтические средства) вместе с любыми требуемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным средством (вспомогательными средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (b) получения второй капсулы, где вторая капсула содержит остальное количество активного (активных) вещества (веществ) и первую капсулу. Дополнительный тип фармацевтической композиции по настоящей заявке в форме таблетки можно получить посредством (а) получения капсулы, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вместе с любыми требуемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным средством (вспомогательными средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (b) получения таблетки, где таблетка содержит остальное количество активного (активных) вещества (веществ) и капсулу.

В примерах по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) применяют либо в качестве таблетки с немедленным высвобождением, либо в качестве таблетки с замедленным высвобождением. Они являются особенно эффективными, будучи представленными в виде таблетки с замедленным высвобождением. Таблетки с замедленным высвобождением, содержащие различные дополнительные терапевтические средства, являются коммерчески доступными. Для пролонгированного действия предпочтительно, чтобы таблетка была представлена в формате с замедленным высвобождением.

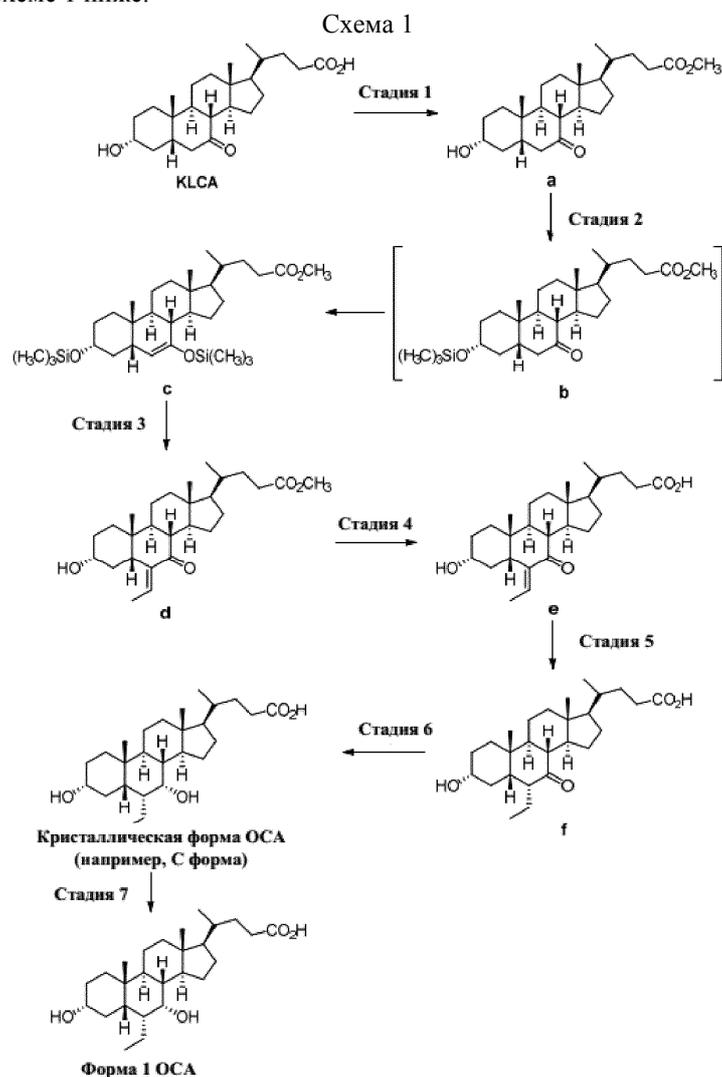
В другом примере фармацевтическая композиция по настоящей заявке предусматривает капсулу, содержащую по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) в капсуле, содержащей первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой. Как правило, в этой форме по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) представлены в форме с немедленным высвобождением. В этом случае обычным является введение композиции три раза в сутки. Другой режим введения заключается в предоставлении композиции, содержащей по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе), в форме с замедленным высвобождением либо с не замедленным высвобождением, описанной выше, два раза в сутки, где суточное количество вводимой композиции содержит достаточное количество активных веществ для обеспечения пациента необходимой суточной дозой.

В одном примере фармацевтические композиции по настоящей заявке представляют собой лекарственную форму, которая содержит первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой в общем суточном количестве, составляющем 0,1-1500 мг, 0,2-1200 мг, 0,3-1000 мг, 0,4-800 мг, 0,5-600 мг, 0,6-500 мг, 0,7-400 мг, 0,8-300 мг, 1-200 мг, 1-100 мг, 1-50 мг, 1-30 мг, 4-26 мг или 5-25 мг.

Фармацевтическая композиция по настоящей заявке может быть использована в течение всей жизни пациентом, продлевая при этом его жизнь. Снижение уровня глюкозы в крови, увеличение секреции инсулина и/или уменьшение инсулинорезистентности обеспечивает замедление развития сопутствующих заболеваний, таких как диабет и ожирение. Комбинация первого соединения и по меньшей мере

одного дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе) является наиболее подходящим средством терапии первичного билиарного цирроза (РВС) с гипергликемией и резистентного первичного билиарного цирроза (РВС). Ввиду упрощенного дозирования, представленного в настоящей заявке, комбинированную терапию по настоящей заявке можно применять в возрастающих дозах в зависимости от веса пациента и клинического эффекта.

Первое соединение, раскрытое в данном документе, можно получить с помощью традиционных способов (например, раскрытых в публикации заявки на патент США № 2009/0062526, в патенте США № 7138390 и в WO 2006/122977), как, например, с помощью 6-стадийного синтеза с последующей одной стадией очистки с получением соединения 1 (обетихоловой кислоты или ОСА) высокой степени чистоты, как показано на схеме 1 ниже.



Вышеупомянутый способ был описан в WO 2013/192097, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте. Данный способ представляет собой 6-стадийный синтез с последующей одной стадией очистки. Стадия 1 представляет собой этерификацию C-24 карбоновой кислоты, представляющей собой 7-кетолитохоловую кислоту (KLCA), с применением метанола в присутствии кислотного катализатора и нагревания с получением сложного метилового эфира, представляющего собой соединение a. Стадия 2 представляет собой получением простого силиленолового эфира из соединения 1 с применением сильного основания с последующей обработкой хлорсиланом с получением соединения c. Стадия 3 представляет собой реакцию альдольной конденсации простого силиленолового эфира, представляющего собой соединение c, и альдегида с получением соединения d. Стадия 4 представляет собой омыление C-24 сложного метилового эфира, представляющего собой соединение d, с получением соединения e. Стадия 5 представляет собой гидрогенизацию 6-этилиденового фрагмента соединения e с получением соединения f. Стадия 6 представляет собой избирательное восстановление 7-кетогруппы соединения f до 7 α -гидроксильной группы с получением кристаллического соединения 1. Стадия 7 представляет собой превращение кристаллического соединения в соединение 1 (форму 1 обетихоловой кислоты или форму 1 ОСА).

Биологическую и/или терапевтическую активности фармацевтической композиции по настоящей заявке можно измерять с помощью стандартных способов, известных в данной области. Без ограничения раскрытия по настоящей заявке в данном документе представлены некоторые подходящие способы.

Выделение гепатоцитов

Для выделения гепатоцитов можно использовать двухстадийный способ перфузии коллагеназой *in situ*. Гепатоциты выделяли из подходящего животного (например, мыши, крысы, кролика, свиньи). После надлежащей перфузии печень разрезали и переносили в буфер для перфузии. Полученную суспензию клеток фильтровали и собирали. Гепатоциты отделяли (например, с применением методики центрифугирования в градиенте плотности перколла).

Многослойная культура гепатоцитов

Выделенные гепатоциты культивировали на покрытых коллагеном планшетах для культур тканей и поддерживали в культуральной среде, дополненной сывороткой крови, пенициллином, стрептомицином, эпидермальным фактором роста, инсулином, глюкоагоном и гидрокортизоном. Для многослойной системы дополнительный гелевый раствор коллагена распределяли по клеткам. Планшеты для культивирования инкубировали при 37°C для обеспечения гелеобразования и прикрепления второго слоя геля. Культуральную среду меняли ежедневно и хранят при -20°C для дополнительного анализа. Фармацевтическую композицию по настоящей заявке использовали в отношении гепатоцитов и последовательно измеряли эффекты в отношении клеток.

Суспензионные культуры гепатоцитов

Сразу после выделения гепатоциты промывали и ресуспендировали. Суспендированные клетки культивировали в отсутствие или в присутствии фармацевтической композиции по настоящей заявке. Могут быть включены положительные контрольные группы (например, клетки, культивируемые в присутствии глюкоагона).

После периода инкубирования определяли глюкозу, высвобожденную в среду (например, с помощью глюкозооксидазного способа с применением набора для анализа Trinder (Sigma)).

Кроме того, использование глюкозы можно определить по образованию насыщенной тритием воды (как для экспериментов по окислению жирных кислот) после инкубирования гепатоцитов в присутствии [5-³H]-глюкозы. Захват 2-[³H]-деоксиглюкозы определяли с инсулином или без инсулина (Perdomo et al., *J. Biol. Chem.* 279, 27177 (2004)). Включение D-[¹⁴C]-глюкозы в гликоген можно измерить в отсутствие или в присутствии инсулина (Perdomo et al. 2004).

Культура клеток HepG2

Клетки гепатобластомы человека (HepG2) выращивали в культуральной среде, как описано в (Wang et al., *Mol. Endocrinol.* 22, 1622 (2008)). На следующий день клетки обрабатывали фармацевтической композицией по настоящей заявке. После обработки клетки обрабатывали с использованием TPA, LPS или TNF- α , а затем собирали для выделения РНК.

Осуществляют транзистентную трансфекцию клеток HepG2 (например, с применением липофектамина 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния)). Через двадцать четыре часа после трансфекции клетки предварительно обрабатывали фармацевтической композицией по настоящей заявке. Клетки последовательно обрабатывали с помощью LPS или TPA или без них. Затем клетки собирали и определяли люциферазную активность с применением системы для анализа с использованием двух репортерных генов люцифераз.

Мышиная модель

Мышей (например, дикий тип или FXFT^{-/-}) содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при стандартном цикле чередования света и темноты 12 ч : 12 ч. Мышам скармливали стандартный корм для грызунов и обеспечивали водой в неограниченном количестве. Мышей подвергали голоданию в течение ночи, а затем инъецировали внутривентриально одну дозу LPS, или фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), или фармацевтической композиции по настоящей заявке, после чего им выпаивали воду в неограниченном количестве. После инъекции мышей умерщвляли, а кровь и печень извлекали для дальнейшего анализа. В ходе проведения процедур придерживались рекомендаций Национальных институтов здравоохранения по уходу за лабораторными животными и их использованию.

Кроличья модель MetS HFD-индуцированную кроличью модель MetS получали, как описано ранее (Filippi et al., *J. Sexual Med.* 6, 3274 (2009)). Самцов породы кроликов Новозеландская белая нумеровали в случайном порядке и распределяли в две разные группы: группу без обработки, получавшую контрольный рацион (CON), или группу с обработкой, получавшую HFD (например, 0,5% холестерина и 4% арахисового масла) в течение 12 недель. Подгруппу кроликов с HFD обрабатывали с использованием фармацевтической композиции по настоящей заявке.

Отбирали образцы крови на исходном уровне и в неделю 12. После 12 недель обработки кроликов умерщвляли и образцы печени, VAT (накопленного между кишечными петлями и брыжейкой тонкой кишки) и желчный пузырь вырезали, взвешивали, собирали и обрабатывали для дальнейших анализов. Образцы VAT от всех групп кроликов также обрабатывали для выделения преадипоцитов. Осуществляли биохимический анализ и анализ гормонов сыворотки крови, как описано ранее в (Filippi et al. 2009, Mo-

relli et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 132, 80 (2012), Vignozzi et al., J. Endocrinology 212, 71 (2012)).

Для оценки эффектов в отношении MetS разработан алгоритм, учитывающий наличие, в качестве вспомогательной переменной, одного или нескольких из следующих факторов: гипергликемия, высокие уровни триглицеридов, высокие уровни холестерина, повышенное кровяное давление и висцеральное накопление жира. Усечения для каждого фактора выведены посредством среднего значения ± 2 S.D. анализируемого параметра, измеренного у кроликов CON. Положительный результат по трем или нескольким факторам указывает на MetS.

Гистоморфометрический анализ VAT

Образцы VAT анализировали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином для измерения диаметра адипоцитов, как описано выше в (Maneschi et al. 2012).

Выявление гипоксии и иммуногистохимическое исследование

Оксигенацию VAT анализировали с применением биовосстанавливающего лекарственного средства, пимонидазола гидрохлорида, вводимого интраперитонеально (i.p.) перед умерщвлением, как описано ранее в (Maneschi et al. 2012, Morelli et al. 2012, 2013, Vignozzi et al. 2012).

Получение общих фракций и мембранных/цитозольных фракций

Для экстракции белков из образцов VAT замороженные ткани измельчали в жидком азоте и разделяли на две аликвоты: одна для экстракции общего белка, а другая для получения мембранного/цитозольного препаратов. Получали мембранные и цитозольные фракции. Экстракты белков количественно оценивали с помощью реагента BCA (Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США) и разделяли с помощью SDS-PAGE. Осуществляли вестерн-блоттинг, как описано ранее в (Maneschi et al. 2012).

Гистологический анализ печени

Стеатоз печени оценивали путем окрашивания срезов печени масляным красным О. Замороженные срезы нарезали в криостате и фиксировали и окрашивали с помощью масляного красного О. После окрашивания масляным красным О срезы промывали и красили гематоксилином и эозином для выделения цветом ядер гепатоцитов. И в завершении, срезы фотографировали и проводили компьютеризированную количественную оценку положительного результата по окрашиванию масляным красным О после вычитания фона с применением программного обеспечения Adobe Photoshop.

Иммуногистохимический анализ маркеров воспаления в срезах печени

Срезы печени инкубировали с первичными антителами к различным маркерам воспаления (например, TNF α , Cd68, И-6, И-1b и И-12). Срезы промывали и инкубировали с биотинилированным вторичным антителом, а затем с комплексом стрептавидин-биотин-пероксидаза. Продукт реакции проявляли с использованием 3',3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида в качестве хромогена (Sigma-Aldrich). Контрольные эксперименты проводили с исключением первичного антитела. Компьютеризированную количественную оценку окрашивания по маркерам воспаления проводили после вычитания фона с применением программного обеспечения Adobe Photoshop.

Выделение, характеристика и дифференцировка преадипоцитов висцеральной жировой ткани кролика

Выделение преадипоцитов кролика (rPAD) из VAT осуществляли, как описано выше (Maneschi et al. 2012). Клетки культивировали в полной культуральной среде. Использовали культуры клеток P1. Осуществляли характеристику rPAD с помощью проточной цитометрии с различными моноклональными антителами (например, CD34-PE, CD45-FITC, CD31-FITC, CD14-PE, CD90-PE, CD106-FITC, и CD105-PE, как описано выше (Maneschi et al. 2012)). Через 2 дня после достижения конfluenceности индуцировали дифференцировку rPAD путем воздействия на них смесью для дифференцировки (DIM) (например, смеси, содержащей 5 мг/мл инсулина, 1 мМ дексаметазона и 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) в DMEM, дополненной 5% очищенной FBS).

Захват глюкозы

Захват глюкозы клетками rPAD измеряли, как описано ранее (Maneschi et al. 2012). Подвергнутые воздействию DIM клетки rPAD культивировали в течение 24 ч в бессывороточной питательной среде с последующей инкубацией при возрастающих концентрациях инсулина для оценки инсулинзависимой стимуляции. В конце периода инкубации rPAD дополнительно инкубировали с ³H-2-дезоксид-глюкозой. Включенную радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционной спектрометрии.

Экспериментальные животные и рационы

Животных содержали по отдельности в стандартных клетках при 22°C с циклом чередования света и темноты 12 ч:12 ч. Мышей приобретали (например, в The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME)). Самцов мышей с дефицитом рецептора GLP-1 (GLP-1RKO) получали от гетерозиготных "семейных" пар (Scrocchi et al., Nat. Med. 2, 1254 (1996)). С целью индукции NASH проверяли два рациона: содержащие высокий уровень жиров, высокий уровень фруктозы и высокий уровень холестерина, где источником жиров были либо транс-жир, либо сало. Рацион с низким содержанием жиров без фруктозы или холестерина использовали в качестве контрольного рациона.

Исследования и введение лекарственного средства

Для характеристики развития NASH мышей Lep^{ob}/Lep^{ob} или B6 содержали при скормливания ра-

циона с низким содержанием жиров (LFD), рациона с высоким уровнем транс-жиров, высоким уровнем фруктозы и высоким уровнем холестерина (HTF), либо рациона с высоким уровнем свиного жира, высоким уровнем холестерина (HLF) (например, в течение 8 или 12 недель). Мышам подкожно имплантировали одноцилиндровый осмотический мининасос, доставляющего либо среду (например, 50% DMSO в стерильной воде), либо фармацевтическую композицию по настоящей заявке. В дополнение или в качестве альтернативы, мышам могли вводить либо среду, либо фармацевтическую композицию по настоящей заявке, которые вводили один раз в сутки посредством желудочного зонда.

Для оценки влияния потери веса тела на конечные точки по отношению к печени можно повторить первичное исследование у мышей Lep^{ob}/Lep^{ob} , которым скармливали рацион LFD или HTF, как описано выше. После 8 недель использования рациона LFD или HTF всем мышам имплантировали осмотический мининасос, доставляющий либо среду, либо фармацевтическую композицию по настоящей заявке. В дополнение или в качестве альтернативы, мышам могли вводить либо среду, либо фармацевтическую композицию по настоящей заявке, которые вводили один раз в сутки посредством разных способов введения, как, например, перорально с помощью желудочного зонда. Субпопуляции группы HTF имплантировали насос, содержащий среду, и ограничивали потребление калорий, чтобы вызвать аналогичную степень потери веса той, которую наблюдают у мышей, обрабатываемых лекарственными средствами.

Гистологический и биохимический анализы ткани печени

При завершении эксперимента ткань печени удаляли оперативным путем и фиксировали (например, в 10% нейтральном забуференном формалине). Ткань печени заливали парафином, получали из нее срезы и помещали на предметные стекла и красили гематоксилином и эозином. Для визуализации фиброза другой набор срезов красили трихромом по Массону. Срезы сначала окрашивали железным гематоксилином Вейгерта, после чего обрабатывали алым красителем Бибриха, фосфорновольфрамовой/фосфорномолибденовой кислотой и анилиновым синим. Второй набор срезов иммунологически окрашивали с применением антитела, нацеленного на маркер макрофага Mac-2. Все гистологические анализы проводил патологоанатом при заслеплении по условиям обработки.

Анализ метаболитов и гормонов в плазме крови

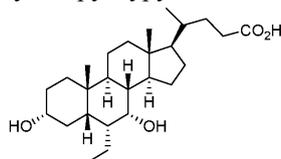
Уровни глюкозы, триглицеридов, общего холестерина, ALT и аспаргатаминотрансферазы (AST) в плазме крови измеряли (например, посредством использования биоанализатора Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Сентер-Вэлли, Пенсильвания)). Образцы плазмы крови разбавляли 1:10 в PBS для определения ALT и AST в диапазоне калибровочной кривой. Измеряли общий плазменный адипонектин (например, с применением коммерчески доступного ELISA, согласно инструкциям производителя (Millipore, Биллерика, Массачусетс)).

Определения

Для удобства определенные термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, собраны в данной части.

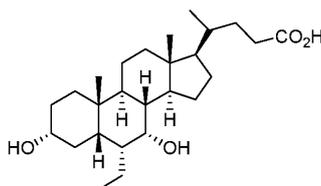
Используемый в данном документе термин "агонист FXR" означает любое соединение, которое активирует FXR. В одном аспекте с помощью агониста FXR достигается по меньшей мере 50% активация FXR по сравнению с CDCA, соответствующим положительным контролем в аналитических способах, описанных в WO 2000/037077. В другом аспекте с помощью агониста FXR достигается 100% активация FXR в сцинтилляционном анализе сближения или HTRF-анализе, описанных в WO 2000/037077. Примеры агонистов FXR включают без ограничения таковые, описанные в патентных документах U.S. 7,138,390; 7,932,244; 20120283234; 20120232116; 20120053163; 20110105475; 20100210660; 20100184809; 20100172870; 20100152166; 20100069367; 20100063018; 20100022498; 20090270460; 20090215748; 20090163474; 20090093524; 20080300235; 20080299118; 20080182832; 20080039435; 20070142340; 20060069070; 20050080064; 20040176426; 20030130296; 20030109467; 20030003520; 20020132223; и 20020120137.

Используемый в данном документе термин "обетихолевая кислота" или "OCA" относится к соединению, имеющему следующую химическую структуру:



Обетихолевая кислота также упоминается как форма I обетихолевой кислоты, INT-747, 3 α ,7 α -дигидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овая кислота, 6 α -этилхенодезоксихолевая кислота, 6-этил-CDCA, 6ECDCA, 6-этил-3,7-дигидрокси-(3 α ,5 β ,6 α ,7 α)-холан-24-овая кислота, и ее можно получить посредством способов, описанных в публикации заявки на патент США № 2009/00 62526 A1, патенте США № 7138390 и WO 2006/122977. Регистрационным номером CAS обетихолевой кислоты является 459789-99-2.

Используемый в данном документе термин "кристаллическая обетихолевая кислота" относится к любой кристаллической форме соединения, имеющего следующую химическую структуру:



Кристаллическая обетихолевая кислота означает, что соединение кристаллизуется в виде определенной упорядоченной структуры с упаковкой кристалла в трех пространственных измерениях или соединение имеет плоскости наружных граней. Твердая форма обетихолевой кислоты может кристаллизоваться в виде различных упорядоченных структур с упаковкой кристалла, при этом все они имеют один и тот же элементный состав обетихолевой кислоты. Различные кристаллические формы обычно характеризуются различными дифракционными рентгенограммами, инфракрасными спектрами, точками плавления, плотностью, твердостью, формой кристаллов, оптическими и электрическими свойствами, стабильностью и растворимостью. Растворитель для перекристаллизации, скорость кристаллизации, температура хранения и другие факторы могут обуславливать доминирование одной кристаллической формы. Кристаллы обетихолевой кислоты можно получить посредством кристаллизации в различных условиях, например, с различными растворителями, температурами и т.д. Примеры кристаллических форм ОСА описаны в находящейся в процессе одновременного рассмотрения публикации на патент США № 20130345188.

Термин "первое соединение" означает соединение формулы I, или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль, или конъюгат с аминокислотой. Во всех случаях, когда данный термин используется в контексте настоящей заявки, следует понимать, что ссылаются на свободное основание, изотопно меченное соединение, кристаллическое соединение или его соответствующие фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, при условии, что такое является возможным и/или приемлемым при данных обстоятельствах.

Используемый в данном документе термин "конъюгаты с аминокислотами" означают конъюгаты первого соединения по настоящей заявке (например, соединения формулы I) с любой подходящей аминокислотой. Например, такой подходящий конъюгат соединения формулы I с аминокислотой будет иметь дополнительное преимущество, заключающееся в повышенной целостности в желчи или кишечном соке. Подходящие аминокислоты включают без ограничения глицин, саркозин и таурин. Таким образом, настоящая заявка охватывает конъюгаты первого соединения по настоящей заявке (например, соединения I) с глицином, саркозином и таурином.

"Осуществление лечения" включает любой эффект, например, уменьшение интенсивности, снижение интенсивности, модулирование или устранение, который приводит в результате к улучшению течения состояния, заболевания, нарушения и т.д. "Осуществление лечения" или "лечение" болезненного состояния включает ингибирование болезненного состояния, т. е. прекращение развития болезненного состояния или его клинических симптомов, или облегчение болезненного состояния, т. е. приводит к временной или постоянной ремиссии болезненного состояния или его клинических симптомов.

"Предупреждение" болезненного состояния включает обуславливание отсутствия развития клинических симптомов болезненного состояния у субъекта, который может быть подвержен болезненному состоянию или предрасположен к нему, но который еще не испытывает или у которого еще не проявляются симптомы болезненного состояния.

Термин "осуществление ингибирования" или "ингибирование", используемый в данном документе, относится к любому выявляемому положительному эффекту в отношении развития или прогрессирования заболевания или состояния. Такой положительный эффект может включать задержку или предупреждение начала проявления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или состояния, ослабление или обеспечение регрессии симптома(симптомов) или признака(признаков) и замедление или предупреждение дальнейшего усугубления симптома(симптомов) или признака(признаков).

"Болезненное состояние" означает любое заболевание, нарушение, состояние, симптом или показание.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", используемый в данном документе, относится к количеству первого соединения (например, лиганда, активирующего FXR) или по меньшей мере одному дополнительному терапевтическому средству (например, дополнительным терапевтическим средствам, описанным в данном документе), которое вызывает кратковременный или длительный терапевтический эффект при введении соответствующей дозы отдельно или в комбинации. В одном примере эффективное количество или терапевтически эффективное количество первого соединения (например, лиганда, активирующего FXR) вызывает кратковременный или длительный терапевтический эффект при введении соответствующей дозы в комбинации по меньшей мере с одним терапевтическим средством (например, дополнительным терапевтическим средством, описанным в данном документе). Данный эффект включает предупреждение, коррекцию, ингибирование или обеспечение регрессии симптомов, признаков заболевания/состояния (например, фиброза печени, почки или кишеч-

ника) и лежащего в его основе патологического процесса, а также связанных с ним осложнений, в любой выявляемой степени. "Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" будет варьироваться в зависимости от первого соединения, дополнительного терапевтического средства (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе), заболевания и его тяжести и возраста, веса и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

Терапевтически эффективное количество первого соединения может быть составлено вместе с одним или несколькими терапевтическими средствами (например, дополнительными терапевтическими средствами, описанными в данном документе) и необязательно с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями для введения человеку или животному, отличному от человека. Соответственно, фармацевтическую композицию по настоящей заявке можно вводить, например, посредством перорального, парентерального путей или наносить местно с обеспечением эффективного количества первого соединения и дополнительных терапевтических средств (например, дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе). В альтернативных примерах композиции по настоящей заявке можно применять для покрытия или пропитывания медицинского изделия, например, стента.

"Фармакологический эффект", как используется в данном документе, охватывает эффекты, полученные у субъекта, посредством которых достигается намеченная цель терапии. В одном примере фармакологический эффект означает, что у субъекта, лечение которого осуществляется, имеет место предупреждение, смягчение или снижение интенсивности проявления первичных показаний. Например, фармакологический эффект будет представлять собой эффект, который приводит в результате к предупреждению, смягчению или снижению интенсивности проявления первичных показаний у субъекта, лечение которого осуществляется. В другом примере фармакологический эффект означает, что у субъекта, лечение которого осуществляется, имеет место предупреждение, ослабление или снижение интенсивности проявления нарушений или симптомов в качестве первичных признаков. Например, фармакологический эффект будет представлять собой эффект, который приводит в результате к предупреждению, смягчению или снижению интенсивности проявления нарушений или симптомов у субъекта, лечение которого осуществляется.

Следует понимать, что изомеры, существование которых обусловлено наличием асимметрических атомов углерода (например, все энантиомеры и диастереоизомеры), включены в объем настоящей заявки, если не указано иное. Такие изомеры можно получить в практически чистой форме посредством классических методик разделения и посредством стереохимически контролируемого синтеза.

"Фармацевтическая композиция" представляет собой состав, содержащий терапевтические средства, такие как первое соединение и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе), в форме, подходящей для введения субъекту. В одном примере фармацевтическая композиция представлена в виде нерасфасованной или стандартной лекарственной формы. Может быть предпочтительным составление композиций в виде стандартной лекарственной формы для облегчения введения и обеспечения равномерности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в данном документе, означает физически обособленные единицы, пригодные в качестве единичных доз для субъекта, лечение которого осуществляется; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного реагента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, совместно с требуемым фармацевтическим носителем. Технические требования к стандартным лекарственным формам по настоящей заявке продиктованы уникальными характеристиками активных средств, а также конкретным терапевтическим эффектом, который должен быть достигнут, и ограничениями, присущими области получения такого активного средства для лечения индивидуумов, и непосредственно зависят от них.

Термин "стандартная лекарственная форма" означает физически обособленные единицы, пригодные в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, совместно с подходящим фармацевтическим наполнителем, описанным в данном документе.

Стандартная лекарственная форма представляет собой любую из множества форм, в том числе, например, капсулу, пакет для IV-вливания, таблетку, одноцилиндровый насос в аэрозольном ингаляторе или флакон. Количество первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой в однократной дозе композиции представляет собой эффективное количество и варьируется в зависимости от конкретного рассматриваемого вида лечения и/или дополнительного(дополнительных) терапевтического средства (терапевтических средств), применяемого(применяемых) для лечения. Специалисту в данной области будет понятно, что иногда необходимо проводить стандартные изменения дозы в зависимости от возраста и состояния пациента. Доза также будет зависеть от пути введения. Предполагается множество путей, в том числе пероральный, внутрилегочный, ректальный, парентеральный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, ингаляционный, трансбуккальный, сублингвальный, интраплевральный, интратекальный, интраназальный и т. п. Лекарственные формы для местного нанесения или трансдермального введения соединения по настоящей заявке включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри

и средства для ингаляции. В одном примере первое соединение и/или по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или распыляющими веществами, которые являются необходимыми.

Используемый в данном документе термин "PO" или "per os" означает пероральный способ введения; "SQ" означает подкожный способ введения; и "QD" означает введение один раз в сутки.

Термин "мгновенная доза" относится к составам, которые представляют собой быстро диспергирующие лекарственные формы.

Термин "немедленное высвобождение" определяется как высвобождение терапевтического средства (такого как первое соединение или по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство) из лекарственной формы за относительно короткий период времени, составляющий, как правило, до приблизительно 60 минут. Термин "модифицированное высвобождение" определяется как включающий отсроченное высвобождение, продленное высвобождение и прерывистое высвобождение. Термин "прерывистое высвобождение" определяется как последовательность событий высвобождения лекарственного средства из лекарственной формы. Термин "замедленное высвобождение" или "продленное высвобождение" определяется как непрерывное высвобождение терапевтического средства из лекарственной формы в течение продолжительного периода.

"Субъект" включает млекопитающих, например, людей, животных-компаньонов (например, собак, кошек, птиц и т. п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей, домашнюю птицу и т. п.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок, птиц и т. п.). В одном примере субъект представляет собой человека. В одном аспекте субъект представляет собой особь женского пола. В одном аспекте субъект представляет собой особь мужского пола.

Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемый" относится к таким соединениям, материалам, композициям, носителям, и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями людей и животных при отсутствии излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с целесообразным соотношением польза/риск.

"Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель" означает носитель или наполнитель, который является применимым в получении фармацевтической композиции, которая в целом является безопасной, нетоксичной и ни с биологической, ни с иной точки зрения не является нежелательной, и включает наполнитель, который является приемлемым для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения в отношении человека. "Фармацевтически приемлемый наполнитель", как используется в описании и формуле изобретения, включает как один, так и более чем один такой наполнитель.

Хотя возможно введение первого соединения непосредственно без какого-либо составления, первое соединение можно вводить в форме фармацевтического состава, содержащего фармацевтически приемлемый наполнитель. Данный состав можно вводить посредством множества путей, в том числе перорального, трансбуккального, ректального, интраназального, трансдермального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и интраназального.

В одном примере первое соединение и/или по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, дополнительные терапевтические средства, описанные в данном документе) можно вводить трансдермально. Для трансдермального введения необходимо средство для трансдермальной доставки ("пластырь"). Такие трансдермальные пластыри можно применять для обеспечения непрерывной или прерывистой инфузии соединения по настоящей заявке в контролируемых количествах. Конструкция и применение трансдермальных пластырей для доставки фармацевтических средств широко известны в данной области. См., например, патент США № 5023252. Такие пластыри могут быть сконструированы для непрерывной, пульсирующей доставки фармацевтических средств или доставки фармацевтических средств по мере необходимости.

В одном примере фармацевтическая композиция по настоящей заявке приспособлена для трансбуккального, и/или сублингвального, или назального введения. В данном примере представлено введение первого соединения таким образом, что это позволяет избежать осложнений со стороны желудка, таких как эффект первого прохождения через желудочною систему и/или через печень. Этот способ введения также может обуславливать уменьшение времени всасывания, обеспечивая при этом более быстрое начало проявления терапевтических полезных эффектов.

Первое соединение можно вводить в пределах широкого диапазона доз. Например, суточные дозы обычно находятся в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 30 мг/кг веса тела. При лечении взрослых людей используют диапазон от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мг/кг/день в виде однократной дозы или разделенной дозы. В одном примере состав содержит от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 1500 мг первого соединения. В другом примере состав содержит от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг первого соединения. В другом примере состав содержит от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг первого соединения. В другом примере состав содержит от приблизительно 1 мг до приблизительно 30 мг первого соединения. В другом примере состав содержит от при-

близительно 4 мг до приблизительно 26 мг первого соединения. В другом примере состав содержит от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг первого соединения. В другом примере состав содержит приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг или приблизительно 50 мг первого соединения. Однако будет понятно, что фактически вводимое количество первого соединения будет определяться врачом с учетом соответствующих обстоятельств, в том числе состояния, подлежащего лечению, выбранного пути введения, формы вводимого первого соединения, вводимого (вводимых) дополнительного (дополнительных) терапевтического средства (терапевтических средств), возраста, веса и ответа отдельного пациента, а также тяжести симптомов пациента. Следовательно, вышеуказанные диапазоны доз не предназначены для ограничения объема настоящей заявки каким-либо образом. В некоторых случаях уровни дозы, более низкие, чем нижний предел вышеуказанного диапазона, могут быть более чем достаточными, при этом в других случаях по-прежнему могут использоваться более высокие дозы без обуславливания какого-либо вредного побочного эффекта, при условии, что такие более высокие дозы вначале разделяют на несколько меньших доз для введения в течение суток.

"Фиброз" относится к состоянию, предполагающему формирование избыточного количества грубоволокнистой соединительной ткани, например, рубцовой ткани, в ткани или органе. Такое образование рубцовой ткани может происходить в ответ на инфекцию, воспаление или повреждение органа вследствие заболевания, травмы, химического токсического действия и т.п. Фиброз может развиваться во множестве различных тканей и органов, в том числе печени, почке, кишечнике, легком, сердце и т. д.

Как используется в данном документе, "холестатическое состояние" относится к любому заболеванию или состоянию, при котором ухудшается или блокируется выведение желчи из печени, что может иметь место в печени либо в желчных протоках. Внутрпеченочный холестаз и внепеченочный холестаз представляют собой два типа холестатических состояний. Внутрпеченочный холестаз (который имеет место внутри печени) наиболее часто наблюдается при первичном билиарном циррозе, первичном склерозирующем холангите, сепсисе (генерализованной инфекции), остром алкогольном гепатите, токсическом воздействии лекарственных средств, полном парентеральном питании (осуществляемом внутривенно), злокачественном новообразовании, муковисцидозе и беременности. Внепеченочный холестаз (который имеет место за пределами печени) может быть вызван опухолью, сужением каналов, кистами, дивертикулами желчных протоков, образованием камней в общем желчевыводящем протоке, панкреатитом, опухолью или псевдокистой поджелудочной железы и сдавливанием вследствие наличия объемного образования или опухоли в близлежащем органе.

Клинические симптомы и признаки холестатического состояния включают: чесотку (зуд), утомляемость, желтушность кожи или глаза, неспособность к перевариванию некоторых видов пищи, тошноту, рвоту, бледный окрас стула, темную мочу и боль в животе в области правого верхнего квадранта. В отношении пациента с холестатическим состоянием можно проводить диагностику и осуществлять следующее наблюдение в клинических условиях с использованием набора стандартных клинических лабораторных тестов, в том числе измерения уровней щелочной фосфатазы, γ -глутамилтранспептидазы (GGT), 5'-нуклеотидазы, билирубина, желчных кислот и холестерина в сыворотке крови пациента. Как правило, у пациента диагностируют наличие холестатического состояния в том случае, если уровни всех трех диагностических маркеров, щелочной фосфатазы, GGT и 5'-нуклеотидазы, в сыворотке крови считаются аномально повышенными. Нормальный уровень этих маркеров в сыворотке крови может в некоторой степени варьироваться от лаборатории к лаборатории и от процедуры к процедуре в зависимости от протокола испытаний. Таким образом, врач будет способен определить с учетом конкретной лаборатории и процедуры тестирования, насколько аномально повышен уровень в крови каждого из маркеров. Например, пациент, страдающий от холестатического состояния, как правило, имеет более чем приблизительно 125 МЕ/л щелочной фосфатазы, более чем приблизительно 65 МЕ/л GGT и более чем приблизительно 17 МЕ/л 5'-нуклеотидазы в крови. Ввиду вариабельности уровня маркеров в сыворотке крови холестатическое состояние можно диагностировать на основании аномальных уровней этих трех маркеров в дополнение по меньшей мере к одному из симптомов, упомянутых выше, таких как чесотка (зуд).

Термин "первичный билиарный цирроз" используют взаимозаменяемо с термином "первичный билиарный холангит" и часто сокращают как PBC. PBC представляет собой аутоиммунное заболевание печени, для которого характерно медленно прогрессирующее разрушение малых желчных протоков печени при поражении внутريدольковых протоков (каналцев Геринга) на ранней стадии заболевания. Если эти протоки поражены, то желчь скапливается в печени (холестаз) и с течением времени приводит к поражению ткани. Это может приводить к рубцеванию, фиброзу и циррозу. Первичный билиарный цирроз характеризуется разрушением междольковых желчных протоков. Гистопатологические изменения при первичном билиарном циррозе включают: воспаление желчных протоков, характеризующееся наличием интраэпителиальных лимфоцитов, и перидуктальные эпителиоидные множественные гранулемы. Существует 4 стадии PBC.

Стадия 1 - портальная стадия: триады нормально размера; портальное воспаление, незначительное поражение желчных протоков. На этой стадии часто выявляются гранулемы.

Стадия 2 - перипортальная стадия: увеличенные триады; перипортальный фиброз и/или воспаление. Как правило, эта стадия характеризуется признаками пролиферации малых желчных протоков.

Стадия 3 - стадия перегородок: активные и/или пассивные фиброзные перегородки.

Стадия 4 - билиарный цирроз. Присутствуют узелки в виде гирлянд.

Термин "первичный склерозирующий холангит" (PSC) представляет собой заболевание желчных протоков, которое вызывает воспаление и последующее нарушение проходимости желчных протоков как на внутриспеченочном (внутри печени), так и на внепеченочном (вне печени) уровне. Воспаление препятствует току желчи в кишечник, что в конечном итоге может привести к циррозу печени, печеночной недостаточности и раку печени.

Термин "неалкогольный стеатогепатит" (NASH) представляет собой воспаление печени, вызванное скоплением жира в печени. У некоторых людей скопление жира вызывает воспаление печени. Вследствие воспаления печень не функционирует так хорошо, как должна. NASH может усугубиться и вызвать рубцевание печени, что приводит к циррозу. NASH аналогичен виду заболевания печени, вызываемому длительным тяжелым пьянством. Однако NASH возникает у людей, которые не злоупотребляют алкоголем.

Термин "орган" означает дифференцированную структуру (как например: в сердце, легком, почке, печени и т. п.), состоящей из клеток и тканей и выполняющей ряд определенных функций в организме. Этот термин также охватывает части тела, выполняющие функцию или взаимодействующие в активности (например, глаз и связанные с ним структуры, которые образуют органы зрения). Термин "орган" дополнительно охватывает любую частичную структуру из дифференцированных клеток и тканей, которая потенциально способна развиться в полную структуру (например, долю или срез печени).

Все публикации и патентные документы, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предполагает признания того, что любой из них имеет отношение к предшествующему уровню техники, а также не составляет какое-либо признание в отношении их содержания или даты публикации. После того, как настоящая заявка была описана в данном документе посредством письменного описания, специалистам в данной области будет понятно, что композиции и способы по настоящей заявке могут осуществляться на практике во множестве примеров и что описание и примеры, представленные в данном документе, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения следующей формулы изобретения.

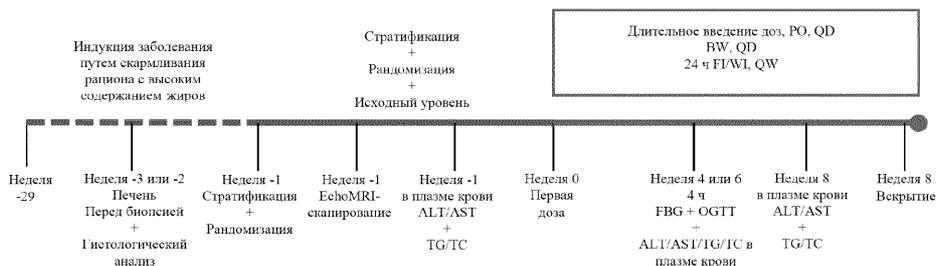
В настоящем описании формы единственного числа также включают формы множественного числа, если в контексте четко не указано иное. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимает специалист в данной области. В случае противоречий настоящее описание будет иметь преимущественную силу. Все процентные содержания и соотношения, используемые в данном документе, если не указано иное, приведены по весу.

Примеры

Пример 1. NASH с ожирением, индуцированный рационом, у мышей C57BL/6J.

Изучения проводили для оценки эффектов обетихоловой кислоты (OCA) и терапевтического средства, которое снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует секрецию инсулина и/или повышает чувствительность к инсулину отдельно или в комбинации, в отношении метаболических параметров, патологии печени и оценки активности NAS в баллах при скармливании рациона, вызывающего NASH с ожирением у мышей. Терапевтическими средствами, используемыми в примерах 2, 3 и 4, были лираглутид (LIRA), метформин (MET) или ситаглиптин (SIT) соответственно. В одном исследовании противогликемическое средство представляло собой эмпаглифлозин (EMP). Кроме того, определение профиля экспрессии генов печени и последующий анализ метаболических путей осуществляли для того, чтобы определить, регулирует ли комбинация новые гены, не регулируемые любым из монотерапевтических средств лечения, и/или регулирует ли она в с большей активностью гены, на которые также влияет монотерапия.

Общий план исследования



Животные, условия содержания и рацион

Самцов мышей C57BL/6 5-недельного возраста приобретали у JanVier, Франция и переносили в помещения для осуществления адаптации перед исследованием. Во время периода акклиматизации и индукции рационом с высоким содержанием жиров мышам содержали в группах по пять особей на клетку в изготовленных на заказ ящиках с циклом чередования света и темноты 12 ч : 12 ч (свет включали с 3АМ до 3РМ) при контролируемых температурных условиях ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; относительной влажности $50 \pm 10\%$). На протяжении всего периода индукции рационом и исследования мышам не ограничивали доступ к рациону с высоким содержанием жиров ($n=110$, DIO-NASH) (D09100301, Research Diet, США) (40% жиров (18% трансжиров), 40% углеводов (20% фруктозы) и 2% холестерина) или к стандартному корму для грызунов ($n=10$, LEAN-CHOW) (Altromin 1324, Брогаарден, Дания) и питьевой воде. Животных содержали на рационе в течение 28 недель перед экспериментом и поддерживали на рационе в течение всего периода исследования. Во время восстановления после оперативного вмешательства и в течение всего периода исследования всех животных содержали по отдельности.

Распределение в исследовании, стратифицированная рандомизация и мониторинг на исходном уровне

Через 27 недель индукции рационом получали биоптат печени для оценки прогрессирования стеатоза в печени путем гистологической оценки. В неделю -2 (комбинация SIT) или -1 (комбинация LIRA и MET) перед введением доз осуществляли стратифицированную рандомизацию в группы обработки в соответствии с оценкой в баллах стеатоза и весом тела. Сканирование животных проводили с использованием EchoMRI (EchoMRI, США) для определения композиционного анализа состава тканей организма. Путем сканирования EchoMRI измеряли массу жировой ткани и массу свободной от жира ткани. Образцы крови отбирали из щеки (субмандибулярно) в состоянии не натощак и в состоянии сознания для анализа уровней ALT, AST, TG и TC в плазме крови на исходном уровне. Процедура перед биопсией

В день оперативного вмешательства мышам анестезировали изофлураном (2-3%) в 100% кислороде. Делали небольшой разрез по срединной линии живота и обнажали левую латеральную долю печени. Кусочек клиновидный фрагмент ткани печени (~100 мг) отрезали от дистальной части доли, взвешивали и фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) для гистологического анализа.

Поверхность разреза печени немедленно электрокоагулировали с помощью биполярной коагуляции (аппарат для электрохирургии ERBE VIO 100). Печень помещали обратно в брюшную полость, и стенку брюшную полость ушивали, а кожу закрывали с помощью аппаратов для наложения скобок. Для восстановления после операции мышам давали карпрофен (5 мг/мл - 0,01 мл/10 г) и подкожно вводили энрофлоксацин (5 мг/мл - 1 мл/кг) в день проведения операции и день 1 и 2 после операции.

Подготовка биоптата печени для гистологической оценки

После выдерживания в течение ночи в 4% PFA биоптаты печени пропитывали в течение ночи парафином в автоматическом гистопротессоре Tissue-TEK VIP от Miles Scientific, а затем заливали в парафиновые блоки. В один блок заливали биоптаты от пяти разных животных. Затем блоки подрезали, и на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific) получали два среза толщиной 3 мкм (для окрашивания H&E). Два блока помещали на одно предметное стекло с получением в общей сложности 10 биоптатов на предметное стекло, представляющих 10 разных животных. Срезы оставляли высохнуть в течение ночи. Оценку степени стеатоза для стратификации и рандомизации в группы обработки осуществлял гистолог в соответствии с описанным в общем у Kleiner et al. (2005) при заслепении по условиям обработки.

Анализ крови и плазмы крови

Образцы крови собирали в 10 мкл гепаринизированные стеклянные капиллярные трубки. Образцы сразу суспендировали в буфере (0,5 мл раствора системы глюкоза/лактат (EKF-diagnostics, Германия) и анализировали содержание глюкозы в день проведения тестирования с применением глюкозиметра BIO-SEN c-Line (EKF-diagnostics, Германия). Для определения содержания триглицеридов и холестерина отбирали 100 мкл крови в пробирки Lithium-Heparin.

За сутки до проведения анализа плазму крови отделяли и образцы хранили при 4°C .

Пероральный глюкозотолерантный тест (OGTT)

В неделю 4 (комбинации LIRA и MET) или в неделю 6 (комбинация SIT) обработки осуществляли OGTT у пребывающих в сознании беспрепятственно движущихся животных. Последнюю дозу лекарственного средства вводили за приблизительно 18 часов до OGTT и животные не получали дозу лекарственного средства до проведения теста. Животных не кормили в течение 4 ч до начала тестирования (доступ к корму ограничивали с 6 АМ до 10 АМ). При $t=0$ мыши получали пероральную болюсную дозу глюкозы (2 г/кг) (200 мг/мл; Fresenius Kabi, Швеция) посредством перорального желудочного зонда (10 мл/кг). Образцы крови отбирали из хвостовой вены (путем надрезания) и измеряли глюкозу в крови в момент времени 0, 15, 30, 60 и 120 мин после перорального введения глюкозы. После забора образцов крови мышам повторно кормили и давали дозу лекарственного средства как обычно.

Выведение из эксперимента и вскрытие

Животных выводили из эксперимента в неделю 8 (день обработки 56) в состоянии не натощак. Последнюю дозу лекарственного средства вводили за приблизительно 18 ч до выведения из эксперимента и животным не вводили дозу лекарственного средства до выведения из эксперимента. У животных инду-

цировали анестезию с помощью CO₂/O₂, и во время анестезии (изофлураном) вскрывали брюшную полость и отбирали кровь из сердца для сбора конечной плазмы крови. При вскрытии отбирали и взвешивали цельную печень. Левую латеральную долю разделяли на фрагменты и мгновенно замораживали в жидком азоте для анализа экспрессии генов и в 4% PFA для гистологического и биохимического анализа. Фрагмент печени мгновенно замораживали в жидком азоте для биохимического анализа.

Обработка ткани печени

Конечная ткань печени. После 8 недель обработки цельную печень отбирали, взвешивали и биоптаты левой латеральной доли печени (~150-200 мг) отрезали и немедленно помещали в 4% PFA и мгновенно замораживали (~50 мг). Фрагмент печени (~100 мг) отбирали в пробирку FastPrep и мгновенно замораживали в жидком азоте.

Фиксация, заливка и получение срезов для гистологического анализа

После фиксации в течение ночи в 4% PFA биоптаты печени пропитывали в течение ночи парафином в автоматическом гистопроцессоре Tissue-TEK VIP от Miles Scientific, а затем заливали в парафиновые блоки. В одном блоке заливали биоптаты от пяти разных животных. Блоки нарезали, и на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific) получали два среза толщиной 3 мкм на блок.

Гомогенизация ткани для анализа триглицеридов печени и холестерина: добавляли 1 мл раствора 5%NH-40/ddH₂O (ab142227, Abcam) в пробирку FastPrep. Пробирки помещали в гомогенизатор FastPrep и встряхивали в течение 2×60 с. После гомогенизации образцы медленно нагревали до 80-100°C в термостате в течение 3 мин. После охлаждения до комнатной температуры повторяли стадию нагрева. Образцы центрифугировали в течение двух минут при максимальной скорости с применением микроцентрифуги для удаления любого нерастворимого материала. Надосадочную жидкость хранили при -80°C до применения. Содержание триглицеридов и холестерина в гомогенатах печени измеряли посредством однократных определений с использованием автоматического анализатора Cobas C-111 с помощью коммерческого набора (Roche Diagnostics, Германия) согласно инструкциям производителя.

Очистка РНК для секвенирования РНК: лизис ткани осуществляли с применением системы MP FastPrep. Вкратце, 30-50 мг биоптата печени гомогенизировали и использовали для экстрагирования РНК на колонках NucleoSpin Plus RNA (Macherey-Nagel) в соответствии с рекомендациями поставщика. Количество РНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

Оценка стеатоза печени

Для оценки стеатоза печени срезы печени окрашивали с помощью H&E с последующим анализом с помощью программного обеспечения Visiomorph (Visiopharm, Копенгаген, Дания).

Окончательную количественную оценку стеатоза описывали в виде процентной доли общей площади с применением протокола, разработанного для конкретной цели. Окрашивание HE: срезы, залитые в парафин, депарафинизировали в ксилоле и регидратировали в ряде этанола разных концентраций. Затем срезы инкубировали в течение 5 мин в гематоксилине Майера (№ по кат. S3309, Dako), промывали в течение 5 мин под проточной водопроводной водой, а затем окрашивали в течение 15 с в растворе эозина Y (№ по кат. HT110280 2.5L, Sigma-Aldrich). Срезы гидратировали, заливал Pertex и обеспечивали высыхание перед сканированием.

Общая оценка активности NAFLD (NAS) в баллах

Оценка активности NAFLD (NAS) в баллах предусматривает числовое значение для пациентов, у которых по всей вероятности имеется NASH, и она представляет собой сумму отдельных баллов стеатоза (0-3), долькового воспаления (0-3) и гепатоцеллюлярного баллонирования (0-3). У большинства пациентов с NASH имеется балл NAS ≥ 5. В данных экспериментах конечную ткань левой латеральной доли печени собирали для оценки NAS с применением клинических критериев, изложенных в общих чертах Kleiner и соавторами (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, Kleiner et al, Hepatology 41; 2005). Критерии, используемые для определения NAS, представлены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Признак	Степень	Оценка в баллах
Стеатоз	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Дольковое воспаление	Без очагов	0
	<2 очагов/200x	1
	2-4 очага/200x	2
	>4 очагов/200x	3

	Отсутствует	0
Баллонизирующая	Несколько	1
дистрофия	Много клеток/выраженное баллонирование	2

Секвенирование РНК: экспрессия терминального гена гепатита и биоинформационный анализ.

Данные секвенирования сравнивали с геномом *Mus musculus*, полученным из базы данных Ensembl, с использованием программного обеспечения Spliced Transcripts Alignment to Reference (STAR). Скрипт на языке python счетчика HTSeq, доступный в пакете HTSeq, использовали для подсчета количества ридов, картированных в аннотированных участках. Все стадии последующего анализа осуществляли как скрипты для R. Для биоинформационного анализа качества данных оценивали с использованием стандартных параметров контроля качества секвенирования РНК. Для оценки меж-и внутригрупповой изменчивости выполняли анализ основных компонентов и иерархическую кластеризацию. Для определения дифференциально экспрессируемых генов использовали R-пакет edgeR. Перечень дифференциально экспрессируемых генов перекрестно ссылался на информацию об установленных биомаркерах NASH. Анализ метаболического пути осуществляли для идентификации метаболических путей, дифференциально нарушенных между группами.

Пример 2. NASH с ожирением, индуцированным рационом, у мышей C57BL/6J.

Обетихоловая кислота (OCA) ± лираглутид (LIRA).

Протоколы и анализы для данного исследования представлены в примере 1.

Группы обработки.

Группа 1: среда (PO)+среда (SQ).

Мышам (n=12) вводили среду в недели 0-8.

Группа 2: OCA (PO)+среда (SQ).

Мышам (n=12) вводили OCA в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 3: LIRA (SQ)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили LIRA в дозе 0,1 мг/кг в недели 0-8.

Группа 4: OCA (PO)+среда (SQ)

Мышам (n=12) вводили OCA в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 5: LIRA (SQ)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили LIRA в дозе 0,4 мг/кг в недели 0-8.

Группа 6: OCA (PO)+LIRA (SQ).

Мышам (n=12) вводили OCA в дозе 10 мг/кг и LIRA в дозе 0,1 мг/кг в недели 0-8.

Группа 7: OCA (PO)+LIRA (PO)

Мышам (n=12) вводили OCA в дозе 30 мг/кг и LIRA в дозе 0,4 мг/кг в недели 0-8.

Группа 8: контрольная группа, получавшая постный корм.

Мышам (n=9) скармливали постный корм в недели 0-8.

Соединения и введение доз

Все мыши получали дозы PO (OCA) или SQ (LIRA) один раз в сутки. День 0 был первым днем введения дозы, тогда как день 55 был последним днем. Следовательно, мышам вводили дозу один раз в сутки с дня 0 до дня 55 включительно. Мыши получали в общем 112 доз либо терапевтического средства, либо только среды. Мышей обрабатывали в промежутке между 2:00-4:00 PM. Растворяли OCA в конечных стандартных концентрациях, равных 1 мг/мл и 3 мг/мл, для получения конечных концентраций доз, равных 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Среды, используемые для OCA, представляли собой 0,5% натрий карбоксиметилцеллюлозу (СМС).

Результаты и обсуждение

Баллы NAS.

Диагноз неалкогольный стеатогепатит (NASH) устанавливали по наличию совокупности характеристик стеатоза, воспаления и гепатоцеллюлярного баллонирования при анализе биоптата печени. Оценка активности NAFLD (NAS) в баллах предусматривает числовое значение для пациентов, у которых по всей вероятности имеется NASH, у большинства пациентов с NASH, имеющих значение $NAS \geq 5$. Оценивали эффекты OCA (10 и 30 мг/кг, PO) и LIRA (0,1 и 0,4 мг/кг, SQ), отдельно и в комбинации, в отношении значений общего и отдельного компонентов NAS у мышей DIO-NASH. Используемая в примере 1А низкодозовая комбинация относится к OCA (10 мг/кг)/LIRA (0,1 мг/кг), в то время как высокодозовая относится к OCA (30 мг/кг)/LIRA (0,4 мг/кг).

На фиг. 1А и 1В изображено снижение баллов NAS в результате применения низкодозовых и высокодозовых комбинаций OCA и LIRA через восемь недель после обработки соответственно. Данные свидетельствуют о том, что как низкодозовые, так и высокодозовые комбинации уменьшают общий балл NAS по сравнению с контрольной группой. В частности, эффект низкодозовой комбинации OCA и LIRA был статистически значимым по сравнению с группой, получавшей среду, также как и только низкую дозу OCA. Наибольшее улучшение NAS составляло приблизительно три пункта. Улучшение при использовании высокодозовой комбинации характеризовалось снижением значения NAS от 4,6 до 1,6 ($p < 0,05$ по

сравнению с монотерапией посредством ОСА) . Примерно два пункта были результатом уменьшения компонента, связанного со стеатозом. Эффект низкодозовой и высокодозовой комбинации ОСА и LIRA в отношении компонента, связанного со стеатозом, продемонстрирован на фигурах 2А и 2В соответственно. Обе комбинации доз обеспечивали статистически значимое улучшение стеатоза ($p < 0,05$ по сравнению с монотерапией ОСА или LIRA).

Триглицериды и холестерин печени

Поскольку жировая инфильтрация печени характеризуется накоплением липидов, в том числе триглицеридов и холестерина, изучали эффект низкодозовых и высокодозовых комбинаций ОСА и LIRA. После восьми недель обработки комбинация обеспечивала статистически значимое уменьшение триглицеридов печени, как показано на фигурах 3А и 3В. Обе комбинации доз обеспечивали уменьшение уровней триглицеридов и холестерина печени, в то время как низкодозовая комбинация предоставляла синергический эффект. Что касается холестерина, то высокодозовая комбинация обеспечивала статистически значимое уменьшение уровня холестерина в печени, как показано на фигурах 4А и 4В.

Вес тела и композиция

В США LIRA назначается в качестве дополнения к образу жизни для длительной коррекции веса тела у людей с ожирением. Однако REMS (Стратегия оценки и снижения рисков) была затребована FDA из-за потенциальных рисков, связанных с LIRA, включающих медуллярную карциному щитовидной железы и риск возникновения острого панкреатита, в том числе некротизирующего панкреатита. Таким образом, очень желательно использование LIRA в более низкой дозе при сохранении ее максимального эффекта относительно снижения веса тела. Эффект низкодозовой комбинации в отношении веса тела представлен на фиг. 5. Как показано на фиг. 5, низкодозовая комбинация ОСА и LIRA обеспечивает синергическое уменьшение веса тела на приблизительно 13% по сравнению только с монотерапией. Что касается состава тканей тела, то на фигурах 6А и 6В показано, что низкодозовые и высокодозовые комбинации обеспечивают уменьшение отложения жира (или массы жировой ткани) относительно массы тела. В частности, высокодозовая комбинация ОСА и LIRA обеспечивала синергическое уменьшение отложения жира у мышей.

Транскриптомный анализ

Секвенирование РНК осуществляли с образцами мРНК печени исследуемых мышей для получения представления о лежащих в основе механизмах и метаболических путях улучшения общего NAS посредством комбинированной терапии. Изучали следующие гены: ген DFFA-подобного эффектора С, индуцирующего гибель клеток; ген эффектора ДНК-связывающего белка 2, содержащего домен смерти; ген 2-гидроксиацил-СоА лиазы 1, ген лектина, связывающего галактозу; ген, подобный гену оксистерол-связывающего белка 3; ген эстрогенового рецептора; инсулин-индуцируемый ген, ген липина 1 и ген шарнирного белка убихинон-цитохром С редуктазы. Сравнивали гены, дифференциально регулируемые низкодозовой и высокодозовой комбинациями, контрольным средством и каждым соответствующим монотерапевтическим средством. Эффект содержания мышей на рационе с высоким содержанием жиров в исследовании иллюстрирует эти процессы, при которых значительное повышение и снижение экспрессии генов изменялось в зависимости от обработки посредством монотерапии или комбинированной терапии.

Количественные значения уровней экспрессии, обусловленные низкодозовой комбинацией, по сравнению с монотерапией, представлены на фиг. 7А-7Е. В табл. 2 описана прогнозируемая функция и качественная регуляция генов, вовлеченных в развитие фиброза. Комбинация, статистически значимо регулирующая экспрессию гена, по сравнению с группой, получавшей среду.

Таблица 2

Ген	Полное (полные) название (названия)	Прогнозируемая функция	Комбинация по сравнению с монотерапией низкой дозой LIRA	Комбинация по сравнению с монотерапией низкой дозой ОСА
CTDEC	Ген DFFA-подобного эффектора С, индуцирующего гибель клеток	Повышен при NASH, способствует накоплению липидных капель в адипоцитах	↓	↓
Dedd2	Ген эффектора ДНК-	Рецептор для хемотаксической	↓	↓

	связывающего белка 2, содержащего домен смерти	активности лимфоцитов		
Has11	Ген 2-гидроксиацил-СоА лиазы 1	Пероксисомальный биологический препарат, расщепляет длинную цепь 2-гидроксижирных кислот	↑	↑
Lgls1	Ген лектина, связывающего галактозу	Моделирует адгезию клетка-клетка, клетка-матрикс	↓	↓
osbp1 3	Ген, подобный гену оксистерол-связывающего белка 3	Регулирует адгезию и организацию клеток	↓	↓

Сравнение уровней экспрессии, обусловленных высокодозовой комбинацией, представлены на фигурах 8А - 8D. В табл. 3 описана прогнозируемая роль или функция каждого гена в развитии NASH.

Таблица 3

Ген	Полное (полные) название (названия)	Прогнозируемая роль или функция	Комбинация по сравнению с лираглутидом в режиме монотерапии	Комбинация по сравнению с ОСА в режиме монотерапии
ER	Эстрогеновый рецептор	Эстроген оказывает защитный эффект в отношении фиброза	↑	↑
INSIG1	Инсулин-индуцируемый ген	Уменьшение приводит к увеличенному синтезу CHOL.	↑	↑
		Понижающая регуляция заключается в снижении CHOL в печени и в конечном итоге прогрессирования NASH		
LPIN1	Ген липина 1	Координирует митохондриальный и глицеролипидный метаболизм в печени	↓	↓
UQCRH	Ген шарнирного белка убихинон-цитохром С редуктазы	Участие во взаимодействии SIRT1 и SIRT3 – обеспечивает повышение содержания SIRT в согласовании с улучшенным состоянием обмена веществ.	↑	↑

Пример 3. NASH с ожирением, индуцированным рационом, у мышей C57BL/6j Обетихолевая кислота (OCA) ± метформин (MET).

Протоколы и анализы для данного исследования представлены в примере 1.

Группы обработки.

Группа 1: среда (PO).

Мышам (n=11) вводили среду (0,5% СМС) в недели 0-8.

Группа 2: ОСА (PO)+среда (PO).

Мышам (n=11) вводили ОСА в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 3: MET (PO)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили MET в дозе 50 мг/кг в недели 0-8.

Группа 4: ОСА (PO)+среда (PO).

Мышам (n=11) вводили ОСА в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 5: MET (PO)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили MET в дозе 150 мг/кг в недели 0-8.

Группа 6: ОСА (PO)+MET (PO).

Мышам (n=12) вводили ОСА в дозе 10 мг/кг и MET в дозе 50 мг/кг в недели 0-8.

Группа 7: ОСА (PO)+MET (PO).

Мышам (n=10) вводили ОСА в дозе 30 мг/кг и MET в дозе 150 мг/кг в недели 0-8.

Группа 8: контрольная группа, получавшая постный корм.

Мышам (n=10) скормливали постный корм в недели 0-8.

Соединения и введение доз

Все мыши получали дозы PO один раз в сутки. День 0 был первым днем введения дозы, тогда как день 55 был последним днем. Следовательно, мышам вводили дозу один раз в сутки с дня 0 до дня 55 включительно. Мыши получали всего 56 доз. Животных подвергали обработке в промежутке между 2:00-4:00 PM. Растворяли ОСА в конечных стандартных концентрациях, равных 1 мг/мл и 3 мг/мл, для получения конечных концентраций доз, равных 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Получали MET в конечных стандартных концентрациях, равных 5 мг/мл и 15 мг/мл, с конечными концентрациями доз, равными 50 мг/кг и 150 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Среда, используемая для ОСА и MET, представляла собой 0,5% натрий карбоксиметилцеллюлозу (СМС).

Результаты

Баллы NAS

Диагноз неалкогольный стеатогепатит (NASH) устанавливали по наличию совокупности характеристик стеатоза, воспаления и гепатоцеллюлярного баллонирования при анализе биоптата печени. Оценка активности NAFLD (NAS) в баллах предусматривает числовое значение для пациентов, у которых по всей вероятности имеется NASH, у большинства пациентов с NASH, имеющих балл NAS ≥ 5 . Оценивали эффекты ОСА (10 и 30 мг/кг, PO) и MET (50 и 150 мг/кг, PO), отдельно и в комбинации, в отношении общего и отдельного компонентов NAS у мышей DIO-NASH. Поскольку в примере 1B низкодозовая комбинация относится к ОСА (10 мг/кг)/MET (50 мг/кг), то высокодозовая комбинация относится к ОСА (30 мг/кг)/MET (150 мг/кг).

На фиг. 9A изображен эффект высокодозовой комбинации ОСА и MET в отношении общего NAS. Высокодозовая комбинация ОСА и MET обеспечивает статистически значимое снижение NAS ($p < 0,05$ по сравнению с ОСА контрольной группы) в конце исследования. Что касается отдельных компонентов, то эффект от высокодозовой комбинации ОСА и MET в отношении компонента, связанного со стеатозом, продемонстрирован на фиг. 9B.

Уровни глюкозы в крови

Пероральный глюкозотолерантный тест (OGTT) представляет собой медицинский тест, при котором перорально вводят глюкозу и после этого отбирают образцы крови для определения времени, за которое происходит выведение глюкозы из крови. Анализ осуществляют для теста на диабет, инсулинорезистентности и нарушения функции бета-клеток. На четвертой неделе исследования перорально вводили дозу глюкозы и через четыре часа анализировали уровни глюкозы в крови. На фигурах 10A и 10B показано, что низкодозовая и высокодозовая комбинации ОСА и MET уменьшают уровень глюкозы в крови в неделю 4 обработки по сравнению с группой, получавшей среду DIO-NASH. В табл. 4 представлены уровни глюкозы в крови (AUC) при использовании низкодозовой и высокодозовой комбинаций, измененных в OGTT.

Таблица 4

Группа обработки	Группа 1	Группа а 2	Группа а 3	Группа а 4	Группа 5	Группа а 6	Группа а 7	Группа а 8
Измеренные в ОГТТ уровни глюкозы в крови, АУС, (ммоль/л x мин) Неделя 4	1762 ± 45	1680 ± 71	1698 ± 31	1778 ± 88	1480 ± 53 **	1538 ± 43 **	1416 ± 33 ** ++	1615 ± 61

АУС означает к площади под кривой; ** P<0,01 по сравнению с группой 1; и ++ P<0,01 по сравнению с группой 6.

Анализ дифференциальной экспрессии генов

Секвенирование РНК осуществляли с образцами мРНК печени исследуемых мышей для получения представления о лежащих в основе механизмах и метаболических путях улучшения общего NAS посредством комбинированной терапии. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с образцами конечной ткани печени, отобранной у животных, обработанных с помощью ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации. Сравнивали гены, дифференциально регулируемые низкодозовой комбинацией и каждым соответствующим монотерапевтическим средством. На фиг. 11 и в данных из табл. 5 раскрыто количество генов, регулируемых с помощью ОСА и МЕТ, отдельно и в комбинации. Как правило, в то время как монотерапевтические средства не изменяли гены по отношению к группе, получавшей среду, ряд генов подвергался уникальной регуляции в результате воздействия комбинации по отношению к группе, получавшей среду, что согласуется с синергическими эффектами в улучшении NASH. Диаграмма Венна на фигурах 12А-12С представляет поверхностное сравнение ряда регулируемых генов. Данные результаты демонстрируют, что уникальные гены, связанные с фиброзом, подвергались регуляции в результате воздействия комбинации по отношению к группе, получавшей монотерапевтическое средство, что согласуется с синергическими эффектами в улучшении NASH.

Таблица 5

Группа обработки	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6	Группа 7
Количество регулируемых генов	21	181	689	120	1109	1858

При использовании низкодозовой комбинации следующие гены из семейства рецептора коллагена подвергались уникальной регуляции: ген коллагена типа 14a1, коллагена типа 6a1 и коллагена типа 6a2. См. фигуры 13А-13С соответственно. Другими представляющими интерес генами, которые подвергались регуляции, являются ген рецептора декорина, ген подсемейства коллектинов, представителя 10, ген рецептора III трансформирующего фактора роста бета и ген трансформирующего фактора роста, бета-индуцированного. См. фигуры 14А-14F.

При использовании высокодозовых комбинаций гены, дифференциально регулируемые в рецепторе семейства коллагена, представляют собой ген коллагена типа 14a1, ген коллагена типа 6a1 и ген коллагена типа 6a2. См. фиг. 15А-15С соответственно. Оценивали другие гены, представляющие интерес, а именно ген бета-формы рецептора фактора роста тромбоцитов, ген декорина, ген подсемейства коллектинов, представителя 10, ген рецептора III трансформирующего фактора роста бета и ген трансформирующего фактора роста бета-индуцированного (фиг. 16А-16Е).

Что касается генов, относящихся к факторам фиброза, особый интерес представляет семейство рецепторов коллагена. Коллаген встречается во многих частях всего тела. Однако около 90% коллагена в теле человека составляет коллаген типа I. В тканях животных присутствует 29 генетически отличающихся типов коллагена. Типы коллагена I, II, III, V и XI самостоятельно упаковываются в D-повторяющиеся поперечно-полосатые фибриллы. В данном D составляет примерно 67 нм и является характеристикой продольной повторяемости коллагена. Они формируют наиболее распространенные типы коллагена у позвоночных.

Рецептор ламинина 1 вовлечен в ремоделирование мембраны (достижение сниженного уровня ламинина необходимо для лечения фиброза). Коллектин кодируется представителем семейства С-лектинов, белками, которые обладают коллагеноподобными последовательностями и доменами распознавания углеводов. Другие представители данного семейства представляют собой секретируемые белки и связываются с углеводными антигенами микроорганизмов, облегчая их узнавание и удаление. Декорин играет

роль в укладке фибрилл коллагена. Связывание этого белка с несколькими рецепторами клеточной поверхности опосредует его роль в подавлении опухолей, включая стимулирующий эффект в отношении аутофагии и воспаление и ингибирующий эффект в отношении ангиогенеза и онкогенеза. Рецептор суперсемейства фактора некроза опухолей и трансформирующие факторы роста вовлечены в прогрессирование воспаления/фиброза.

Пример 4. NASH с ожирением, индуцированным рационом, у мышей C57BL/6j.

Обетихоловая кислота (OCA) ± ситаглиптин (SIT).

Протоколы и анализы для данного исследования представлены в примере 1.

Группы обработки.

Группа 1: среда (PO)+среда (PO).

Мышам (n=11) вводили среду (0,5% СМС) в недели 0-8.

Группа 2: OCA (PO)+среда (SQ).

Мышам (n=11) вводили OCA в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 3: SIT (PO)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили SIT в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 4: OCA (PO)+среда (SQ).

Мышам (n=11) вводили OCA в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 5: SIT (PO)+среда (PO).

Мышам (n=12) вводили SIT в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 6: OCA (PO)+SIT (PO).

Мышам (n=12) вводили OCA в дозе 10 мг/кг и SIT в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 7: OCA (PO)+SIT (PO).

Мышам (n=10) вводили OCA в дозе 30 мг/кг и SIT в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 8: контрольная группа, получавшая постный корм.

Мышам (n=10) скармливали постный корм в недели 0-8.

Соединения и введение доз.

Все мыши получали дозы PO один раз в сутки. День 0 был первым днем введения дозы, тогда как день 55 был последним днем. Следовательно, мышам вводили дозу один раз в сутки с дня 0 до дня 55 включительно. Мыши получали всего 56 доз. Животных подвергали обработке в промежутке между 2:00-4:00 PM. Растворяли OCA в конечных стандартных концентрациях, равных 1 мг/мл и 3 мг/мл, для получения конечных концентраций доз, равных 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Получали SIT в конечных стандартных концентрациях, равных 5 мг/мл и 15 мг/мл, с конечными концентрациями доз, равными 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Среда, используемая для OCA и SIT, представляла собой 0,5% натрий карбоксиметилцеллюлозу (СМС).

Результаты

Активность DPP-IV

Изучали эффекты OCA (10 и 30 мг/кг, PO), отдельно и в комбинации с SIT (10 и 30 мг/кг, PO), в отношении активности DPP-IV в плазме крови мышей DIO-NASH в неделю 2 после обработки. Низкодозовая комбинация относится к OCA (10 мг/кг)/SIT (10 мг/кг), тогда как высокодозовая комбинация относится к OCA (30 мг/кг)/SIT (30 мг/кг). Низкодозовая комбинация OCA и SIT обеспечивают статистически значимое снижение активности DPP-IV ($p < 0,01$ по сравнению со средой DIO-NASH). Кроме того, высокодозовая комбинация OCA и SIT обеспечивают статистически значимое снижение активности DPP-IV ($p < 0,01$ по сравнению со средой DIO-NASH). Фармакологические результаты демонстрируют, что терапевтические средства, оказывали ожидаемые эффекты, например, ингибирование DPP-IV.

Пример 5. Обетихоловая кислота (OCA) ± эмпаглифлозин (EMP).

Группы обработки.

Группа 1: среда (PO).

Мышам вводили среду (0,5% СМС) в недели 0-8.

Группа 2: OCA (PO)+среда (PO).

Мышам вводили OCA в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 3: EMP (PO)+среда (PO).

Мышам вводили EMP в дозе 3 мг/кг в недели 0-8.

Группа 4: OCA (PO)+среда (PO).

Мышам вводили OCA в дозе 30 мг/кг в недели 0-8.

Группа 5: EMP (PO)+среда (PO).

Мышам вводили EMP в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 6: OCA (PO)+EMP (PO).

Мышам вводили OCA в дозе 10 мг/кг и LIRA в дозе 3 мг/кг в недели 0-8.

Группа 7: OCA (PO)+EMP (PO).

Мышам вводили OCA в дозе 30 мг/кг и LIRA в дозе 10 мг/кг в недели 0-8.

Группа 8: контрольная группа, получавшая постный корм.

Мышам (n=10) скармливали постный корм в недели 0-8.

Соединения и введение доз

Все мыши получали дозы РО один раз в сутки. День 0 был первым днем введения дозы, тогда как день 55 был последним днем. Следовательно, мышам вводили дозу один раз в сутки с дня 0 до дня 55 включительно. Мыши получили всего 56 доз. Животных подвергали обработке в промежутке между 2:00-4:00 PM. Растворяли ОСА в конечных стандартных концентрациях, равных 1 мг/мл и 3 мг/мл, для получения конечных концентраций доз, равных 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Получали ЕМР в конечных стандартных концентрациях, равных 5 мг/мл и 15 мг/мл, с конечными концентрациями доз, равными 3 мг/кг и 10 мг/кг соответственно. Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг. Среда, используемая для ОСА и ЕМР, представляла собой 0,5% натрий карбоксиметилцеллюлозу (СМС).

В Honda, et al., "The Selective SGLT2 Inhibitor Ipr адлифлозин Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice", PloS, 2016, описано, что ингибиторы натрийзависимых котранспортеров глюкозы типа 2 (а именно эмпаглифлозин) были исследованы относительно их эффекта у мышей DIO-NASH.

Пример 6. Многослойная культура гепатоцитов.

Реагенты и растворы

Подходящая среда для культивирования клеток включает среду Веймаута MB-752/1, среду Хэма F12, RPMI 1640, среду Игла в модификации Дульбекко, среду Вильямса E, среду Лейбовица L15 и модифицированную среду Чи. Коллагеназу типа IV, коллаген типа I, перколл, культуральную среду и добавки, добавляемые в культуральную среду (например, сыворотку крови, антибиотики, аминокислоты, гормоны, такие как DEX, инсулин и факторы роста), буфер для перфузии и другие растворы были коммерчески доступными или полученными из коммерчески доступных материалов. В многослойной культуре гепатоцитов можно использовать другие типы коллагена (типы II-IV), ламинин, фибронектин и гепарансульфатсодержащие протеогликаны. Однако было показано, что коллаген типа I и IV превосходил фибронектин и ламинин при культивировании клеток.

Выделение гепатоцитов

Для выделения гепатоцитов использовали двухстадийный способ перфузии коллагеназой *in situ*. Вкратце, гепатоциты выделяли из самок крыс Lewis. Животных анестезировали. Вначале осуществляли перфузию печени через воротную вену *in situ* с помощью буфера для перфузии. Средство для перфузии уравнивали перед поступлением в печень. Затем осуществляли перфузию печени коллагеназой в буфере для перфузии. Затем печень разрезали и переносили в ледяной буфер для перфузии. Капсулу печени отделяли и полученную суспензию клеток фильтровали. Клеточный осадок собирали с помощью центрифугирования и ресуспендировали. В суспензию добавляют перколл и гепатоциты отделяли с применением методики центрифугирования в градиенте плотности перколла. Смесь центрифугировали и клеточный осадок дважды промывали средой. Жизнеспособность гепатоцитов определяли по вытеснению трипанового синего. В качестве альтернативы, вместо свежeweделенных гепатоцитов использовали криоконсервированные гепатоциты.

Многослойная культура гепатоцитов

Выделенные гепатоциты культивировали на покрытых коллагеном планшетах для культур тканей и поддерживали в культуральной среде, дополненной сывороткой крови, пенициллином, стрептомицином, эпидермальным фактором роста, инсулином, глюкозагоном и гидрокортизоном. Гелеобразующий раствор коллагена получали путем смешивания раствора коллагена типа I и культуральной среды. Планшеты для культур тканей покрывали гелеобразующим раствором и инкубировали при 37°C для обеспечения образования геля. Гепатоциты высевали при соответствующей плотности и поддерживали при 37°C. Культуральную среду заменяли каждые 24 ч.

Для многослойной системы дополнительный гелевый раствор коллагена распределяли по клеткам после 1 дня культивирования. Культуральную среду осторожно удаляли с тем, чтобы обеспечивать равномерное распределение второго слоя коллагенового геля по всему планшету. Культуральные планшеты инкубировали при 37°C для обеспечения гелеобразования и прикрепления второго слоя геля до замены среды. Культуральную среду меняли ежедневно. Образцы среды хранили при -20°C для дальнейшего анализа.

Гепатоциты, культивируемые между слоями гелеобразного коллагена, сохраняют трехмерную кубическую форму и распределение белков цитоскелета, аналогично наблюдаемому *in vivo*.

Оптимизация образования сети желчных канальцев

Для оптимизации накопления таурохолатата и экскреции желчи в многослойной культуре гепатоцитов можно использовать определенную культуральную среду, такую как среда Вильямса E и среда Игла в модификации Дульбекко.

Тестируемые препараты

Агонист FXR, предназначенный для исследования, представляет собой обетихоловую кислоту, также известную как "ОСА" и 6-этилхенодезоксихолевая кислота (6-ECDCA).

Пример 7. Оценка эффектов тестируемых препаратов в отношении высвобождения глюкозы из клеток печени.

Выделение гепатоцитов

Образцы печени получали от 6-месячных самок свиней после 12 ч голодания. Ткани отбирали у животных. Гепатоциты выделяли посредством модифицированного двухстадийного способа перфузии коллагеназой *in situ* на основе процедуры, описанной Seglen (Seglen, *Methods in Cell Biol.* 13, 29 (1976)). В течение 15 мин животного умерщвляли, удаляли правую долю печени, а затем проводили перфузию в буфере для перфузии печени при 37°C в течение 15-20 мин, после чего в среде для ферментативного расщепления печени в течение 20-30 мин. Гепатоциты выделяли путем мягкого разрушения подвергнутой ферментативному расщеплению печени в суспензионной среде [26,5 мМ NaHCO₃, 8,99 мМ Na-HEPES, 0,2% (вес/об.) BSA фракция V, 2,22 мМ D-фруктозы в DMEM с 5,5 мМ глюкозы и 1 мМ Na пирувата] и фильтровали через сито 200 мкм. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 500 об./мин, надосадочную жидкость сливали и клеточный осадок ресуспендировали в предварительно нагретой (37°C) суспензионной среде. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием способа вытеснения трипанового синего (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью Йорк) и она постоянно превышала 85%. Определение количества клеток проводили в трех образцах и получали среднее значение.

Суспензионные культуры

Сразу после выделения гепатоциты трижды промывали бесывороточной средой DMEM без глюкозы или пирувата, а затем ресуспендировали в 600 мкл той же среды при плотности клеток 30×10⁶/мл в 50 мл конических пробирках. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 10, 20 и 40 мин с продолжительным встряхиванием отдельно или с возрастающими концентрациями соединения по настоящей заявке (например, ОСА) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, который описан в данном документе). В каждом эксперименте выход глюкозы после стимуляции с использованием 100 нМ глюкагона использовали в качестве положительного контроля.

После периода инкубирования определяли глюкозу, высвобожденную в среду, с помощью глюкозооксидазного способа с применением набора реактивов Trinder (Sigma), и результаты всех повторностей нормализовали по содержанию белка, которое определяли с применением набора для анализа белков Bio-Rad.

Пример 8. Оценка эффектов тестируемых препаратов в отношении метаболизма глюкозы в клетках печени.

Культура клеток

У самцов крыс Sprague-Dawley выделяли гепатоциты (200-250 г) посредством перфузии печени коллагеназой, как описано ранее (Brown et al., *Biochem. J.* 262, 425 (1989)). Жизнеспособность клеток оценивали по вытеснению трипанового синего, которая обычно превышает 90%. В покрытые коллагеном планшеты с шестью лунками загружали 10⁶ живых клеток на лунку с 2 мл среды Игла в модификации Дульбекко, содержащей 10% (об./об.) эмбриональной телячьей сыворотки. Через 1 ч, в течение которого к планшету прикреплялись только живые клетки, среду отсасывали аспиратором (наряду с неприкрепившимися мертвыми клетками) и заменяли ее свежей средой. Клетки поддерживали в течение 48 ч (по меньшей мере с одной заменой среды в течение 24 ч). Процедуры с использованием животных соответствуют критериям гуманного ухода Национальной академии наук.

Метаболизм глюкозы

Параметры метаболизма глюкозы в гепатоцитах измеряли после 18-часового инкубирования в отсутствии или в присутствии соединения по настоящей заявке (например, ОСА) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе). Использование глюкозы определяют по образованию насыщенной тритием воды (как для экспериментов по окислению жирных кислот) после инкубирования гепатоцитов в течение 2 ч в присутствии [5-³H]-глюкозы (6,5 мкКи/мл). Захват 2-[³H]-дезоксиглюкозы (DOG; 10 мкмоль/л, 0,5 мкКи/мл) определяли через 5 мин после 30-минутного предварительного инкубирования со 100 нмоль/л инсулина или без него в течение каждого периода (Perdomo et al., *J. Biol. Chem.* 279, 27177 (2004)). Через 1 ч измеряли включение D-[¹⁴C]-глюкозы (2 мкКи/мл) в гликоген в отсутствие или в присутствии инсулина (Perdomo et al. 2004).

Пример 9. Оценка эффектов тестируемых препаратов в отношении метаболизма глюкозы в клетках печени и у мышей.

Культура клеток и транзистная трансфекция

Клетки гепатобластомы человека (HepG2) высевали в 6-луночные планшеты (1×10⁶ клеток/лунка) и выращивали в полной культуральной среде [среде Игла в модификации Дульбекко с высоким содержанием глюкозы (с L-глутамином), дополненной 10% (об./об.) инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и 1% (об./об.) антибиотиков - противогрибковых препаратов], как описано в (Wang et al., *Mol. Endocrinol.* 22, 1622 (2008)). На следующий день клетки обрабатывали соединением по настоящей заявке (например, ОСА) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе). Через 18 ч после обработки клетки обрабатывали с

использованием TPA (50 нМ), LPS (1 мкг/мл) или TNF- α (10 нг/мл), а затем собирали для выделения РНК после 6-часового инкубирования.

Проводили транзientную трансфекцию клеток HepG2 с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Клетки предварительно обрабатывали соединением по настоящей заявке (например, OCA) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе) в течение 18 ч, если не указано иное. Клетки обрабатывали с помощью LPS или TPA или без них. После 6-часового инкубирования клетки собирали и люциферазную активность определяют с применением системы для анализа с использованием двух репортерных генов люциферазы в соответствии с инструкциями производителя (Promega, Мэдисон, Висконсин). Активность люциферазы нормализовали посредством котрансфекции плазмиды с последовательностью, кодирующей люциферазу Renilla, под управлением регуляторной последовательности гена тимидинкиназы, pHRL-ТК. Данные выражали в виде относительной кратной активации по отношению к такой у нестимулированных наборов.

Первичная культура гепатоцитов мыши

Первичную культуру гепатоцитов 8-недельных мышей получали, как описано в (Huang et al., Mol. Endocrinol. 18, 2402 (2004), Huang et al., J. Clin. Invest. 113, 137 (2004), Qiao et al., Mol. Biol. Cell 12, 2629 (2001)). Клетки обрабатывали соединением по настоящей заявке (например, OCA) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе). Через восемнадцать часов после обработки клетки обрабатывали с использованием LPS (20 мкг/мл), TPA (150 нМ) или TNF- α (10 нг/мл), а затем собирали для выделения РНК после 6-часового инкубирования.

Выделение РНК и количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Проводили выделение общей РНК из клеток HepG2, первичных гепатоцитов мышей и печени мышей и количественную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР), как описано в (Yang et al., Cancer Res. 67, 863 (2007)). Амплификацию β -актина использовали в качестве внутреннего стандарта.

Животные

Использовали мышей восьминедельного возраста, если не указано иное. Мышей дикого типа или FXR^{-/-} содержали в виварии в условиях отсутствия патогенной микрофлоры при стандартном цикле чередования света и темноты 12 ч :12 ч. Мышам скармливали стандартный корм для грызунов и обеспечивали водой в неограниченном количестве. Восьминедельных самок мышей дикого типа и мышей FXFT^{-/-} подвергали голоданию в течение ночи, а затем им инъецировали внутривентриально одну дозу LPS (20 мг/кг), или фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), или соединение по настоящей заявке (например, OCA) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе), а затем выпаивали питьевую воду без ограничения доступа. Через 6 ч после инъекции мышей умерщвляли, а кровь и печень извлекали для дальнейшего анализа. В ходе проведения процедур придерживались рекомендаций Национальных институтов здравоохранения по уходу за лабораторными животными и их использованию.

Пример 10. Оценка эффектов тестируемых препаратов в отношении животной модели.

Инсулинорезистентность является предполагаемым ключевым фактором, лежащим в основе механизма, связывающего дисфункцию жировой ткани (АТ) с воспалением печени и стеатозом при метаболическом синдроме (MetS). Было продемонстрировано, что OCA уменьшает тяжесть инсулинорезистентности и метаболический профиль с выраженным уменьшением количества висцерального АТ (VAT) у (HFD)-индуцированной кроличьей модели MetS при использовании рациона с высоким содержанием жиров. Анализ VAT и печени с помощью иммуногистохимического исследования, вестерн-блоттинга и RT-PCR показали, что введение доз OCA *in vivo* нормализует размер адипоцитов, гипоксию и экспрессию перилипина и цитозольного инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 (SLC2A4), которые значительно повышены в VAT, выделенного у кроликов HFD, по сравнению с кроликами на контрольном рационе. Введение доз OCA *in vivo* также способствовало нормализации экспрессии маркеров стеатоза и воспаления у кроликов HFD.

Кроличья модель MetS HFD-индуцированную кроличью модель MetS получали, как описано ранее (Filippi et al., J. Sexual Med. 6, 3274 (2009)). Самцов породы кроликов Новозеландская белая весом приблизительно 3 кг/кг нумеровали в случайном порядке и распределяли в две разные группы: группу без обработки, получавшую контрольный рацион (CON), или группу с обработкой, получавшую HFD (например, 0,5% холестерина и 4% арахисового масла) в течение 12 недель. Подгруппу кроликов HFD обрабатывали соединением по настоящей заявке (например, OCA) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе). Дозу используемой OCA подбирали с учетом эффективности и фармакокинетического анализа, проведенного у грызунов (Pellicciari et al., J. Med. Chem. 45, 3569 (2002)). Дозы дополнительного терапевтического средства, а именно такие, которые описаны в данном документе, можно также выбирать с учетом эффективности и фармакокинетического анализа у животных (например, мышей, крыс, кроликов, свиней), как

описано в литературе.

Образцы крови получали из краевой ушной вены на исходном уровне и в неделю 12 во всех группах. Перед умерщвлением проводили измерение среднего артериального давления и пероральный глюкозотолерантный тест, как описано выше (Filippi et al. 2009). После 12 недель обработки кроликов умерщвляли с использованием смертельной дозы пентобарбитала (100 мг/кг) и осторожно вырезали образцы печени, VAT (накопленного между кишечными петлями и брыжейкой тонкой кишки) и желчный пузырь, взвешивали, собирали и обрабатывали для последующих анализов. Образцы VAT от всех групп кроликов обрабатывали для выделения преадипоцитов. Осуществляли биохимический анализ и анализ гормонов сыворотки крови, как описано ранее в (Filippi et al. 2009, Morelli et al., *J. Steriod Biochem. Mol. Biol.* 132, 80 (2012), Vignozzi et al., *J. Endocrinology* 212, 71 (2012)).

Для оценки эффектов в отношении MetS разработан алгоритм, учитывающий наличие, в качестве вспомогательной переменной, одного или нескольких из следующих факторов: гипергликемия, высокие уровни триглицеридов, высокие уровни холестерина, повышенное кровяное давление и висцеральное накопление жира. Усечения для каждого фактора выведены посредством среднего значения ± 2 S.D. анализируемого параметра, измеренного у кроликов CON. Положительный результат по трем или нескольким факторам указывает на MetS.

Размер образца

Предполагая вероятность возникновения MetS, составляющую 2,5% в группе CON, и вероятность, составляющую 60% в группе HFD, (Filippi et al. 2009, Vignozzi et al., *J. Sexual Med.* 8, 57 (2011), Vignozzi et al. 2012, Maneschi et al., *J. Endocrinology* 215, 347 (2012), Morelli et al. 2012, Morelli et al., *Prostate* 73, 428 (2013)), использование 74 кроликов с коэффициентом распределения 1:1 между группами позволит использовать мощность, близкую к 100%, в отличие от разницы в скорости развития MetS между двумя группами обработки. Предполагая вероятность возникновения MetS, равную 60%, в группе, которая получала HFD, и вероятность, равную 10%, в группе, которая получала HFD и соединение по настоящей заявке (например, OCA) вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе) (Vignozzi et al. 2011, Morelli et al. 2012), использование 54 кроликов с коэффициентом распределения 2:1 позволит использовать мощность, равную приблизительно 95%, в отличие от разницы в скорости развития MetS между двумя группами обработки.

Гистоморфометрический анализ VAT

Образцы VAT анализировали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином для измерения диаметра адипоцитов, как описано выше (Maneschi et al. 2012), с применением микроскопа Nikon Microphot-FXA (Nikon, Токио, Япония), оснащенного бесплатным программным обеспечением ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США), учитывая, что адипоциты должны быть правильной сферической формы.

Выявление гипоксии и иммуногистохимическое исследование

Оксигенацию VAT анализировали с применением биовосстанавливающего лекарственного средства пимонидазола гидрохлорида (hуpохурpоbe-1, 60 мг/кг), вводимого i.p. за 1 ч до умерщвления, как описано выше (Maneschi et al. 2012, Morelli et al. 2012, 2013, Vignozzi et al. 2012).

Получение общих фракций и мембранных/цитозольных фракций для вестерн-блоттинга

Для экстракции белков из образцов VAT замороженные ткани измельчали в жидком азоте и разделяли на две аликвоты: одна для экстракции общего белка, а другая для получения мембранно-цитозольного препаратов. Мембранные и цитозольные фракции получали с применением набора для экстрагирования внутриклеточного протеома ProteoExtract (Calbiochem-Merck KGaA, Дармштадт, Германия), согласно инструкциям производителя. Экстракты белка количественно оценивали с помощью реагента BCA (Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США) и 15 мг каждого образца обрабатывали с помощью 10% SDS-PAGE. Осуществляли вестерн-блоттинг в отношении антитела к переносчику глюкозы типа 4 (GLUT4) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, Нью-Йорк, США) и антитела к перилипину (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), как описано выше (Maneschi et al. 2012). Равную загрузку белка проверяли путем повторного зондирования мембраны с помощью антитела к актину (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) Денситометрический анализ интенсивности полосы осуществляли с применением программного обеспечения Adobe Photoshop.

Гистологический анализ печени

Стеатоз печени оценивали путем окрашивания срезов печени масляным красным O. Замороженные срезы нарезали в криостате и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре (RT). Затем срезы обрабатывали в течение 2-5 мин изопропанолом и окрашивали с помощью масляного красного O в течение 20 мин. Готовили масляный красный O путем разбавления маточного раствора (0,3 г масляного красного O в 100 мл изопропанола) водой (3:2) с последующей фильтрацией. После окрашивания масляным красным O срезы несколько раз промывали водой и окрашивали гематоксилином и эозином для выделения цветом ядер гепатоцитов. И в завершении, срезы фотографировали и проводили компьютеризированную количественную оценку положительного результата по окрашиванию масляным красным O после вычитания фона с применением программного обеспечения Adobe Photoshop.

Иммуногистохимический анализ маркеров воспаления в срезах печени

Срезы печени инкубируют в течение ночи при 48°C с первичными антителами к разным маркерам воспаления (например, TNF α , Cd68, И-6, И-1b и И-12). Срезы споласкивали в PBS и инкубировали с биотинилированным вторичным антителом, а затем с комплексом стрептавидин-биотин-пероксидаза (Ultra-vision large volume detection system anti-polyvalent, Lab Vision, Фримонт, Калифорния, США). Продукт реакции проявляли с использованием 3',3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида в качестве хромогена (Sigma-Aldrich). Контрольные эксперименты проводили с исключением первичного антитела. Срезы оценивали и фотографировали с использованием микроскопа Nikon Microphot-FXA. Компьютеризированную количественную оценку окрашивания по маркерам воспаления проводили после вычитания фона с применением программного обеспечения Adobe Photoshop.

Выделение, характеристика и дифференцировка преадипоцитов висцеральной жировой ткани кролика

Выделение преадипоцитов кролика (rPAD) из VAT осуществляли, как описано ранее (Maneschi et al. 2012). Вкратце, образцы VAT подвергали ферментативному расщеплению с помощью 1 мг/мл коллагеназы типа 2 (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч, обрабатывали буфером для лизиса красных кровяных телец (155 mM NH $_4$ Cl, 10 mM KHCO $_3$ и 0,1 mM EDTA; 10 мин при К.Т.), затем центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при К. Т., ресуспендировали в полной среде (DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки (FBS), 100 мг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, 2 mM L-глутамина и 1 мг/мл амфотерицина-B; Sigma-Aldrich) и фильтровали через 150 мкм сетчатый фильтр для удаления дебриса. И завершении, конце клетки культивировали в полной культуральной среде при 37°C в увлажненной атмосфере из 95% воздуха - 5% CO $_2$. Через 4-5 дней культивирования получали субконфлюэнтную (90% культуры клеток в планшете) и однородную популяцию фибробластоподобных клеток в пассаже 0 (P0). Субконфлюэнтные клетки трипсинизировали и высевали на планшеты для культивирования клеток (P1). Для всех экспериментов использовали только культуры P1, и эксперименты повторяли с применением по меньшей мере трех различных препаратов rPAD для каждой экспериментальной группы. Характеристику rPAD осуществляли посредством проточной цитометрии со следующими конъюгированными моноклональными антителами: CD34-PE, CD45-FITC, CD31-FITC, CD14-PE, CD90-PE, CD106-FITC (BD Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния, США) и CD105-PE (Ansell, Бейпорт, Миннесота, США), как описано ранее (Maneschi et al. 2012). Через 2 дня после достижения конfluence (время 0) индуцировали дифференцировку rPAD путем воздействия на них смесью для дифференцировки (DIM), содержащей 5 мг/мл инсулина, 1 мМ дексаметазона и 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) в DMEM, дополненной 5% очищенной FBS в течение 8 дней. Каждые 48 ч меняли культуральную среду, а затем клетки переносили в среду, содержащую 5 мг/мл инсулина, на 48 ч.

Захват глюкозы

Захват глюкозы клетками rPAD измеряли, как описано ранее (Maneschi et al. 2012). Подвергнутые воздействию DIM клетки rPAD культивировали в течение 24 ч в бессывороточной питательной среде с последующим инкубированием при возрастающих концентрациях инсулина (1, 5, 10 и 50 нМ), разбавленного в фосфатном буфере Krebs, не содержащем глюкозу (2,5 ммоль Са $_2$ C и 1 мг/мл BSA), для оценки инсулинзависимой стимуляции. В конце периода инкубации rPAD дополнительно инкубировали с 3 H-2-дезоксид-глюкозой (16 мМ (1 мКи/мл); ICN Pharmaceuticals, Коста-Меса, Калифорния, США) в течение 5 мин. Клетки промывали PBS и лизировали с использованием NaOH 0,5 M, и включенную радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционной спектрометрии с применением β -детектора (Perkin-Elmer). Данные нормализовали по содержанию белка.

Статистический анализ

Результаты выражены в виде среднего значения \pm S.E.M. для п экспериментов, как указано. Проводили статистический анализ с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия множественных сравнений Тьюки-Крамера для того, чтобы оценить различия между группами, при этом $p < 0,05$ считается значимым. Корреляцию оценивали с помощью метода Спирмена, а статистический анализ осуществляли с помощью пакета программ обработки статистических данных для общественных наук (SPSS, Inc.) для Windows 15.0. Последовательно использовали множественные линейные регрессии для многофакторного анализа, когда это необходимо. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC $_{50}$) и значения максимального эффекта (E $_{max}$) рассчитывали с использованием компьютерной программы ALLFIT.

Пример 11. Оценка эффектов тестируемых препаратов в отношении животной модели.

Экспериментальные животные и рационы

Животных содержали по отдельности в стандартных клетках при 22°C с циклом чередования света и темноты 12 ч:12 ч. Самцов мышей C57BL6 (B6) или Lep ob /Lep ob в возрасте ~7 недель приобретали в The Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн). Рационы для тестирования получали от Research Diets (Нью-Брун-свик, Нью-Джерси). Для индукции NASH тестировали рацион с высоким содержанием жиров (40% ккал) и высоким содержанием фруктозы (22% по весу), при этом источником жиров являлись трансжиры (шортенинг Primex на основе частично гидрогенизированного растительного масла, № по кат. D09100301). Рацион с низким содержанием жиров (10% ккал/жир) без фруктозы или холестерина ис-

пользовали в качестве контрольного рациона (№ по кат. D09100304). Рацион HTF считается превосходным для индуцирования NASH и его использовали в последующих исследованиях.

Исследования и введение лекарственного средства Для характеристики развития NASH на данных рационах мышей Lep^{ob}/Lep^{ob} или В6 содержали либо на рационе с низким содержанием жиров (LFD), рационе с высоким содержанием транс-жиров, высоким содержанием фруктозы и высоким содержанием холестерина (HTF), либо на рационе с высоким содержанием свиного жира, высоким содержанием холестерина (HLF) в течение 8 или 12 недель соответственно. Мышам подкожно имплантировали одноцилиндровый осмотический мининосос (модель 2004; Alzet, Купертино, Калифорния), доставляющего либо среду (50% DMSO в стерильной воде), либо соединение по настоящей заявке (например, ОСА), вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе). В дополнение или в качестве альтернативы, мышам могли вводить либо среду, либо фармацевтическую композицию по настоящей заявке, которые вводили один раз в сутки посредством желудочного зонда. Вес тела измеряли еженедельно. Состав тканей тела измеряли на исходном уровне (в день перед имплантацией насоса) и при выведении из эксперимента с проведением NMR (Echo Medical Systems, Хьюстон, Техас).

Для оценки влияния потери веса тела на конечные точки по отношению к печени повторяли первичное исследование у мышей Lep^{ob}/Lep^{ob}, которым скармливали рацион LFD или HTF, как описано выше. После 8 недель использования рациона LFD или HTF всем мышам перорально вводили соединение по настоящей заявке (например, ОСА), вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством (например, таким, которое описано в данном документе) в течение 8 или 12 недель.

При выведении из эксперимента ткань печени вырезали и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (в течение по меньшей мере 7 дней при комнатной температуре). Затем ткань печени заливали парафином, получали из нее срезы и помещали на предметные стекла и красили гематоксилином и эозином. Для визуализации фиброза другие наборы срезов окрашивали сириусом красным (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Срезы сначала окрашивали железным гематоксилином Вейгерта, после чего обрабатывали алым красителем Бибриха, фосфорновольфрамовой/фосфорномолибденовой кислотой и анилиновым синим. Второй набор срезов иммунологически окрашивали с применением антитела, нацеленного на маркер макрофага Mac-2 (Cedarlane Laboratories, Берлингтон, Северная Каролина) в соответствии со стандартными протоколами. Все гистологические анализы проводил патологоанатом при заслепленном по условиям обработки.

Общие липиды печени экстрагировали из печени с применением протокола на основе публикации Folch et al. (J. Biol. Chem. 226, 4 97 (1957)). Примерно 0,5 г замороженной ткани печени гомогенизировали в 10 мл раствора хлороформ/метанол 2:1. Гомогенат фильтровали с применением обезжиренной бумаги и переливали с помощью воронки в предварительно взвешенную стеклянную пробирку для центрифугирования объемом 15 мл. Затем добавляли дополнительные 5 мл раствора хлороформ/метанол 2:1, а затем 2,5 мл 0,9% NaCl. Отфильтрованный экстракт последовательно смешивали и центрифугировали при 2000 об./мин при 10°C в течение 5 мин. Водный слой сливали, а пробирку продували азотом до тех пор, пока липидный осадок не становился сухим. Пробирку, содержащую липидный осадок, повторно взвешивали и рассчитывали общее количество экстрагированных липидов на грамм исходной ткани печени.

Для проведения вестерн-блоттинга взвешивали вырезанную ткань печени, затем мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до обработки. Белки выделяли из фрагмента каждой печени, как указано далее. Замороженную ткань печени измельчали на сухом льду, а затем гомогенизировали в буфере для лизиса с ингибиторами протеаз (№ по кат. 05892791001; Roche Complete Tablets; и 0,6 mM PMSF). Концентрацию белка в очищенной надосадочной жидкости измеряли с помощью набора для анализа белка с использованием BCA (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Лизаты ткани печени (50 мкг) разделяли в гелях NuPAGE в восстанавливающих условиях и переносили на мембраны PVDF, согласно протоколам производителя (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Мембраны вырезали в промежутке между маркерами размером 50 и 60 кДа и блокировали с помощью 5% Blotto; верхнюю половину метили антителом к коллагену типа I (1:350; № по кат. NBP1-30054; Novus Biologicals, Литтлтон, Колорадо), а для нормализации нижнюю половину метили антителом к GAPDH (1:10,000; конъюгированным с пероксидазой хрена; № по кат. 3683; Cell Signaling Technologies, Данверс, Массачусетс). После инкубирования с антителом к иммуноглобулину кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена, экспрессию белка выявляли с помощью усиленной хемилюминесценции (Pierce), а денситометрию осуществляли с использованием системы FluorChem (Cell Biosciences, Санта-Клара, Калифорния).

Экспрессия генов в ткани

При выведении из эксперимента образцы печени вырезали, взвешивали, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили (-80°C). Общую РНК экстрагировали с использованием реагента TRI (Ambion, Остин, Техас) на колонках RNeasy (Qiagen, Чатсворт, Калифорния), а кДНК синтезировали с использованием системы для обратной транскрипции RETROscript RT-PCR (Ambion).

Количественную ПЦР в режиме реального времени (секвенатор ABI PRISM 7900; Applied Biosys-

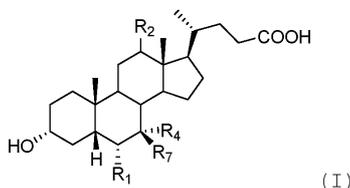
tems; Фостер-Сити, Калифорния) проводили для анализа генов, участвующих в патологическом процессе NASH (например, генов, участвующих в стеатозе, воспалении и фиброзе). Можно проводить анализ с использованием продуктов для анализа экспрессии генов Assays-on-Demand и универсального мастермикса в формате TaqMan (Applied Biosystems).

Анализы метаболитов и гормонов в плазме крови

Уровни глюкозы, триглицеридов, общего холестерина, ALT и аспартатаминотрансферазы (AST) в плазме крови измеряли посредством использования биоанализатора Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Сентер-Вэлли, Пенсильвания). Образцы плазмы крови разбавляли 1:10 в PBS для определения ALT и AST в диапазоне калибровочной кривой. Измеряли общий плазменный адипонектин (например, с использованием коммерчески доступного ELISA, согласно инструкциям производителя (Millipore, Биллерика, Массачусетс)).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая агонист FXR, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство стимулирует секрецию инсулина, где агонист FXR представляет собой соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, где

R₁ представляет собой водород или незамещенный C₁-C₆алкил;

R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

R₄ представляет собой гидроксил или водород и

R₇ представляет собой гидроксил или водород,

где по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой лираглутид и где фармацевтическая композиция находится в форме для перорального введения.

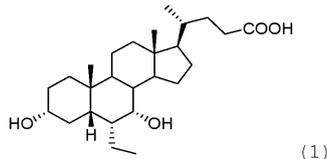
2. Фармацевтическая композиция по п.1, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆алкил.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где R₁ представляет собой метил, этил или пропил.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где R₁ представляет собой этил.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, где R₄ представляет собой гидроксил, а R₇ представляет собой водород.

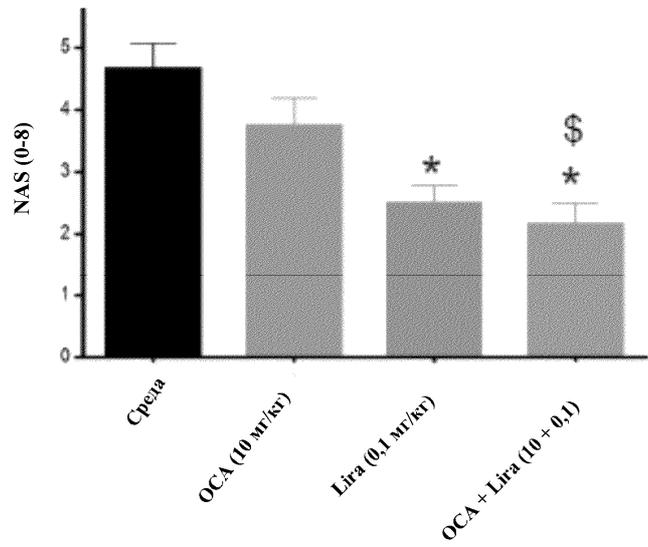
6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение I



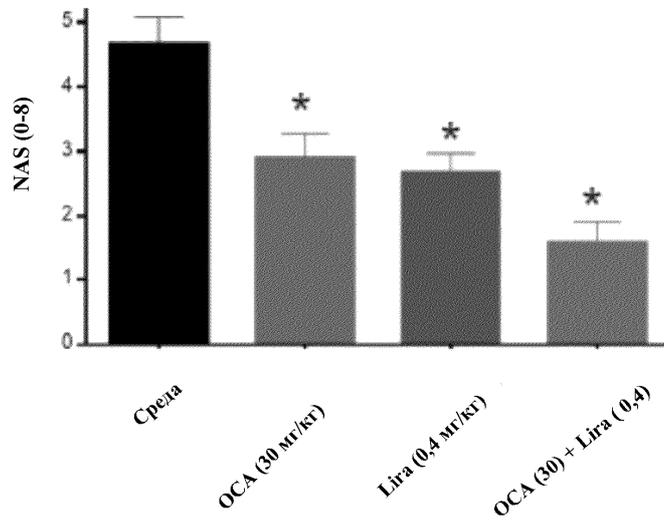
или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой лираглутид и где фармацевтическая композиция находится в форме для перорального введения.

7. Способ лечения или предупреждения неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) или неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий введение фармацевтической композиции по п.1 или 6 нуждающемуся в этом субъекту.

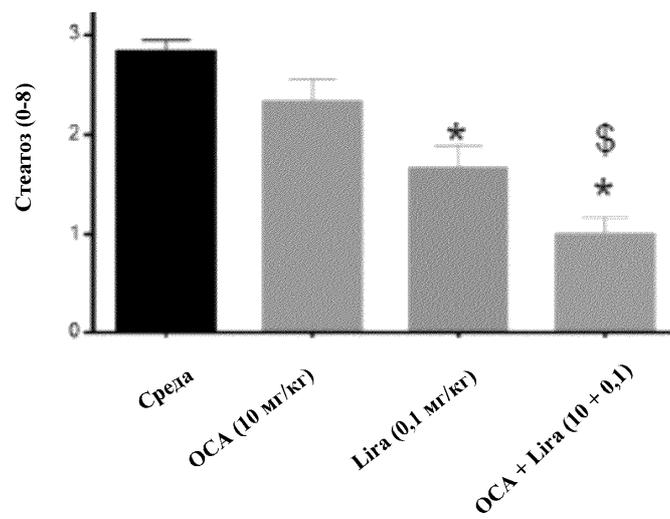
8. Способ по п.7, где заболевание или состояние представляет собой NASH.



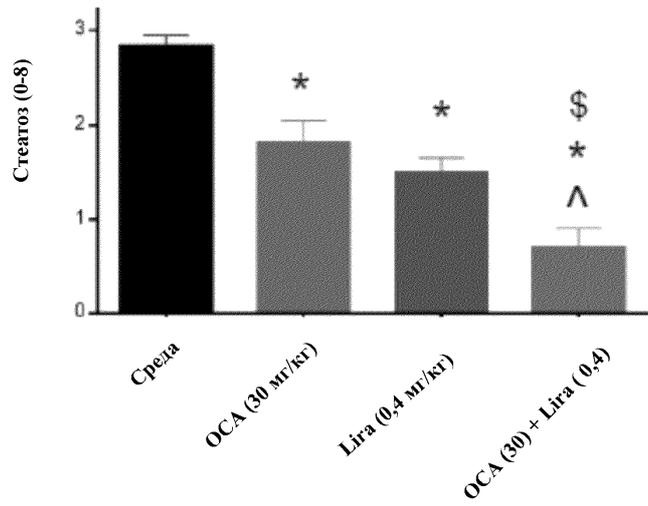
Фиг. 1А



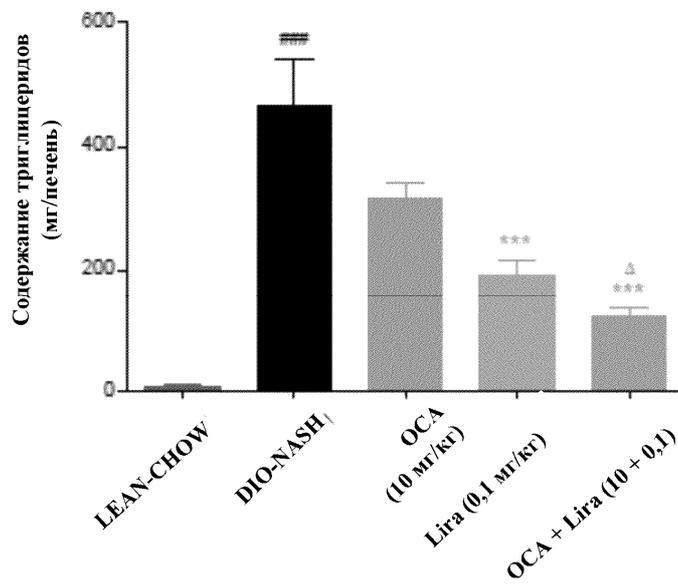
Фиг. 1В



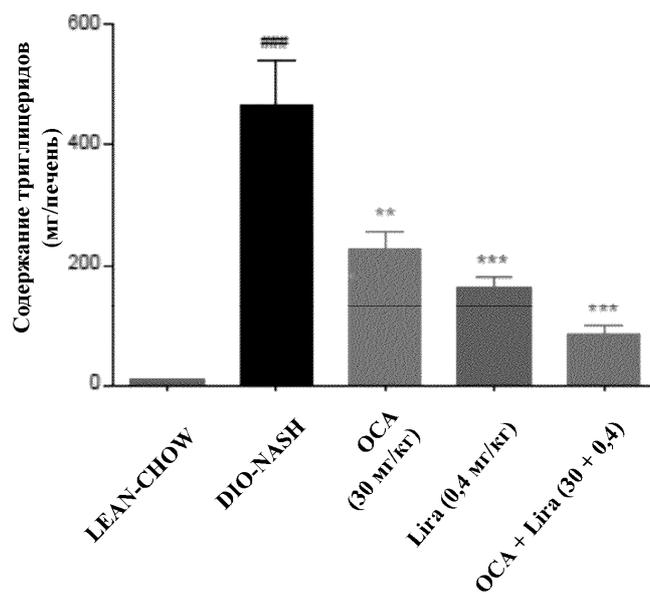
Фиг. 2А



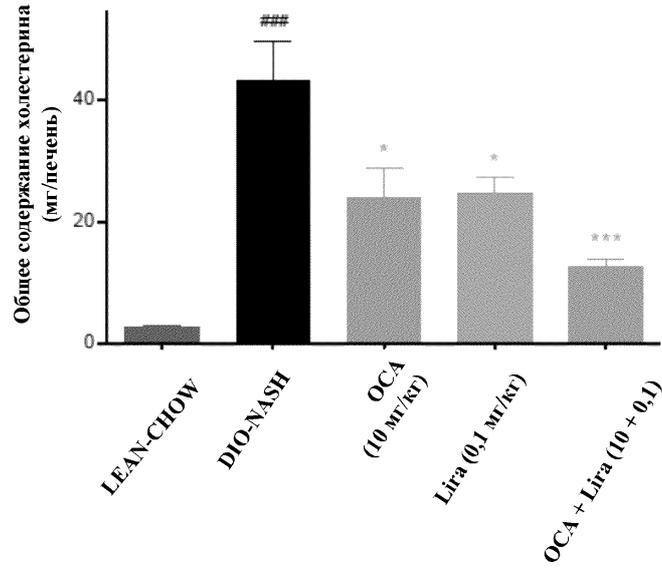
Фиг. 2В



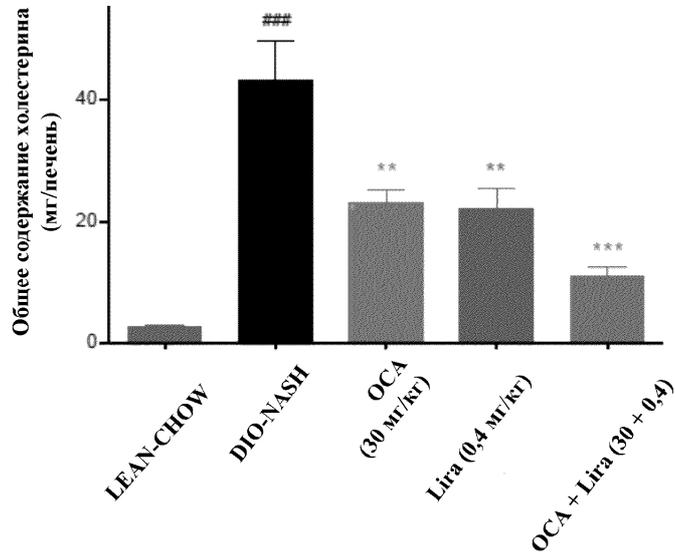
Фиг. 3А



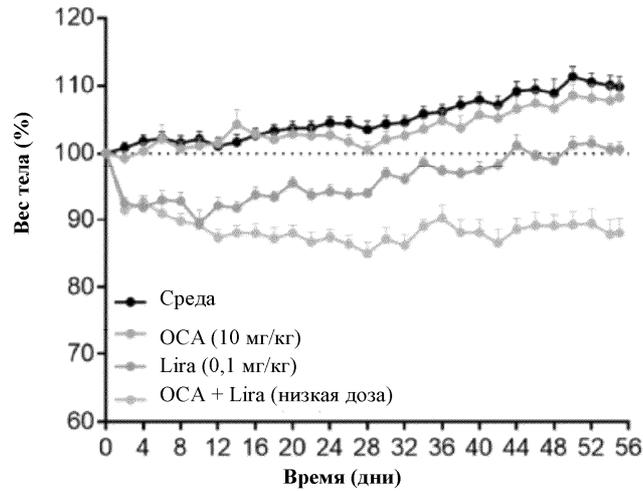
Фиг. 3В



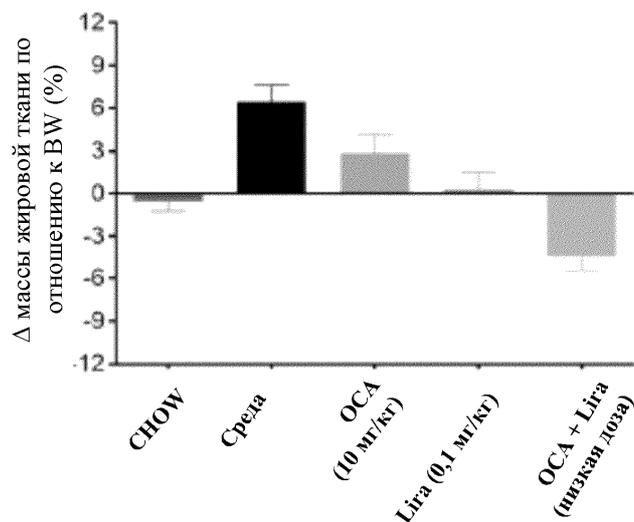
Фиг. 4А



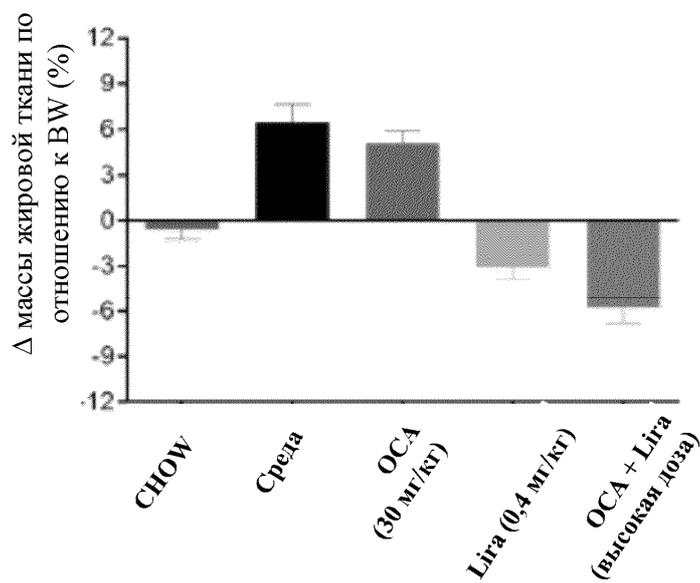
Фиг. 4В



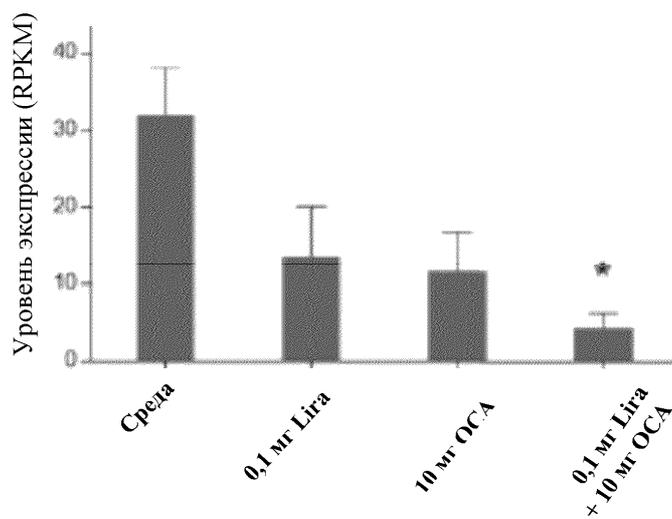
Фиг. 5



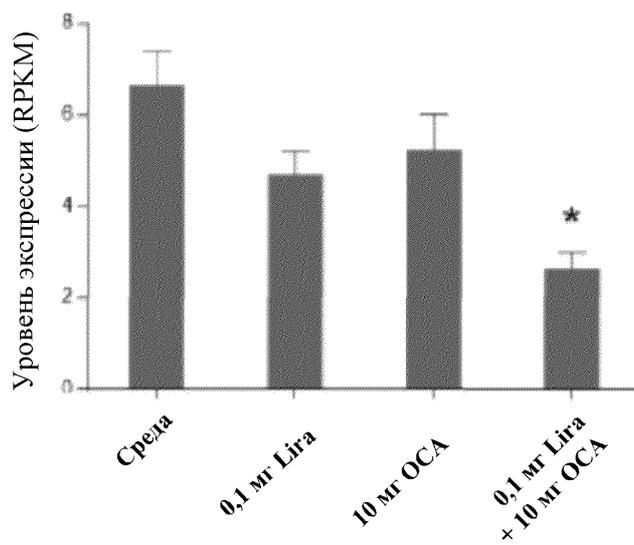
Фиг. 6А



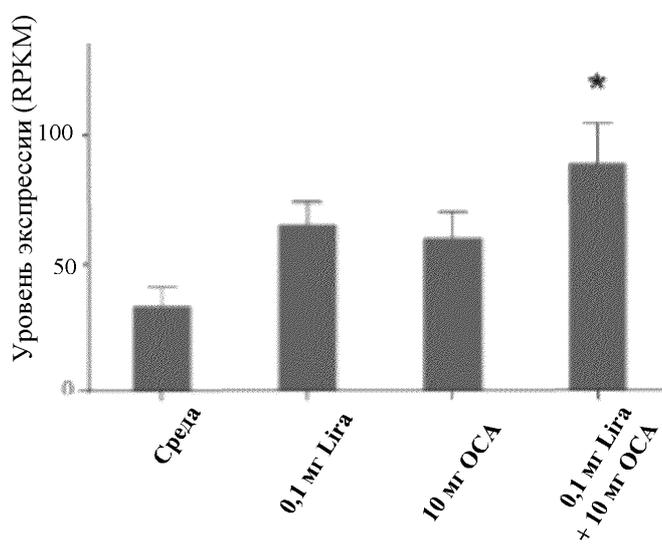
Фиг. 6В



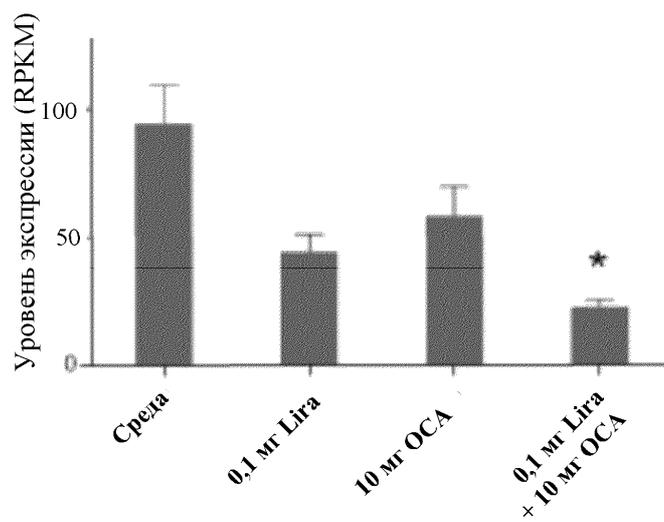
Фиг. 7А



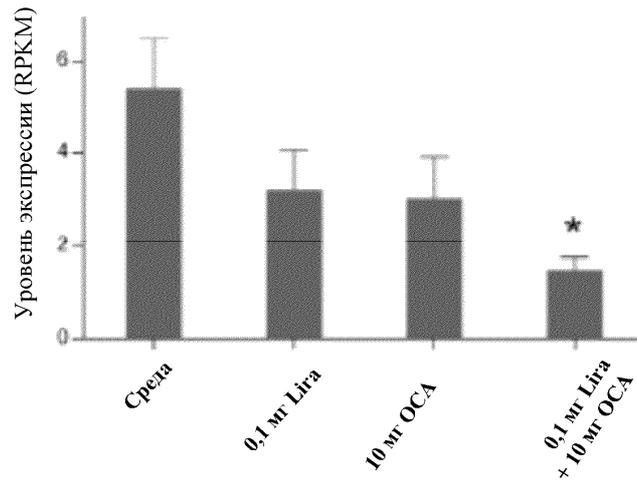
Фиг. 7В



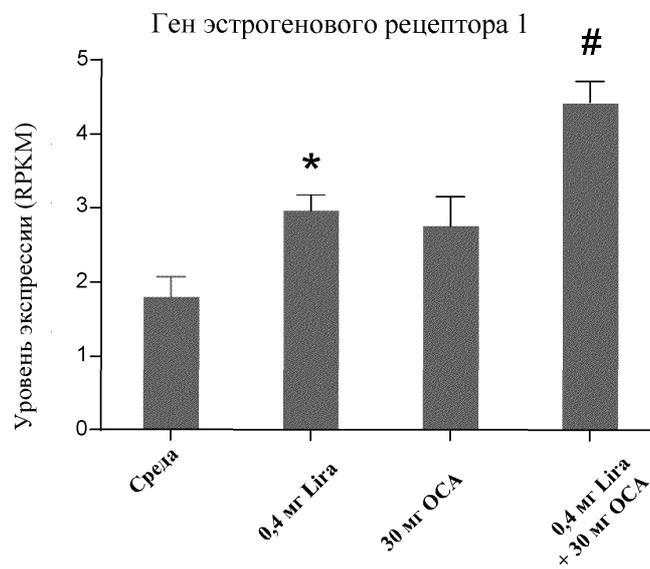
Фиг. 7С



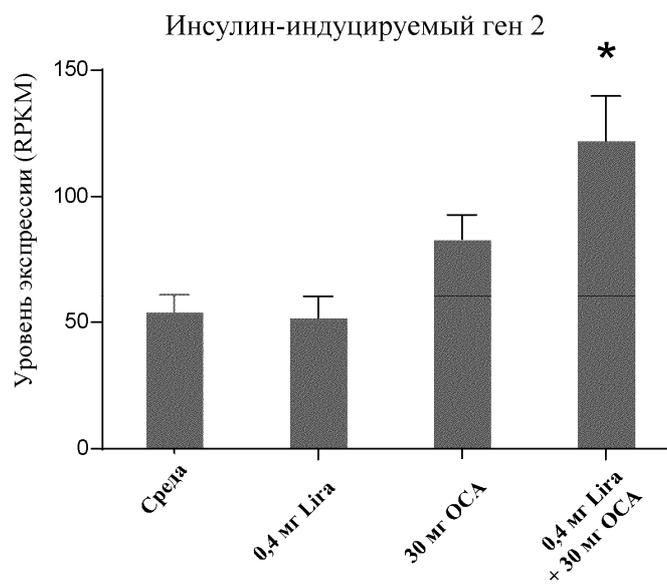
Фиг. 7D



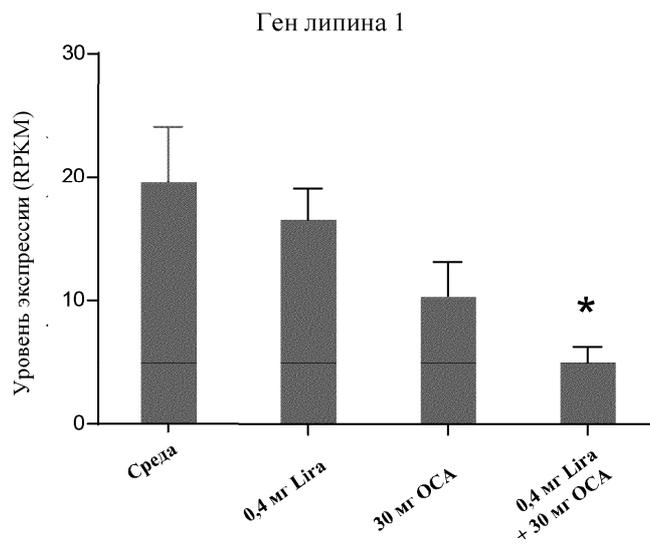
Фиг. 7Е



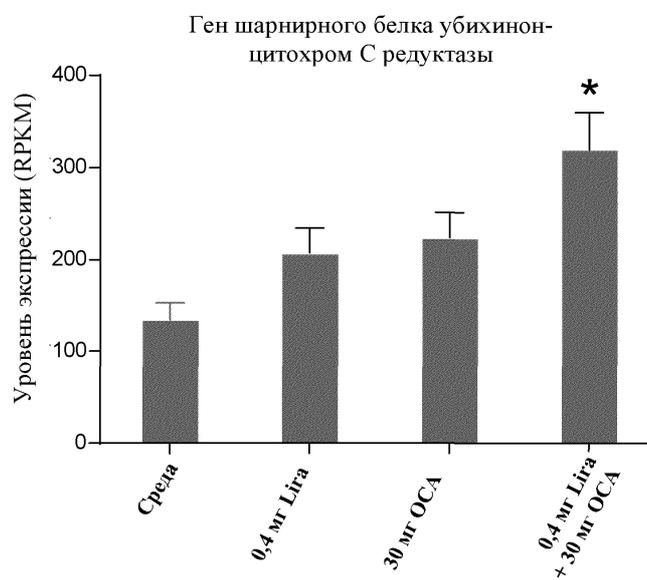
Фиг. 8А



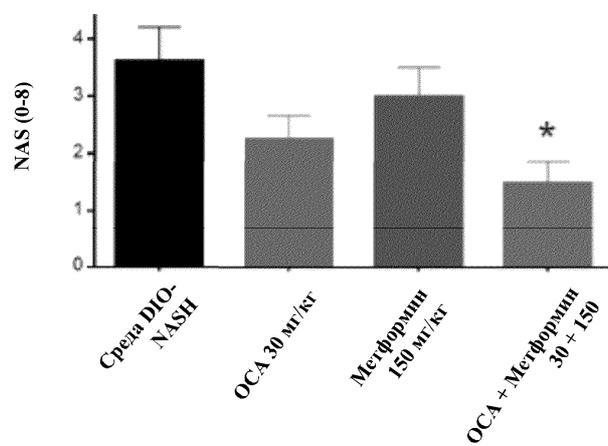
Фиг. 8В



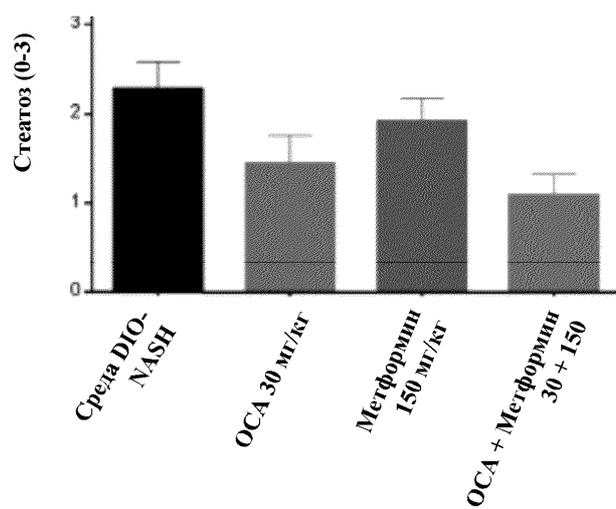
Фиг. 8С



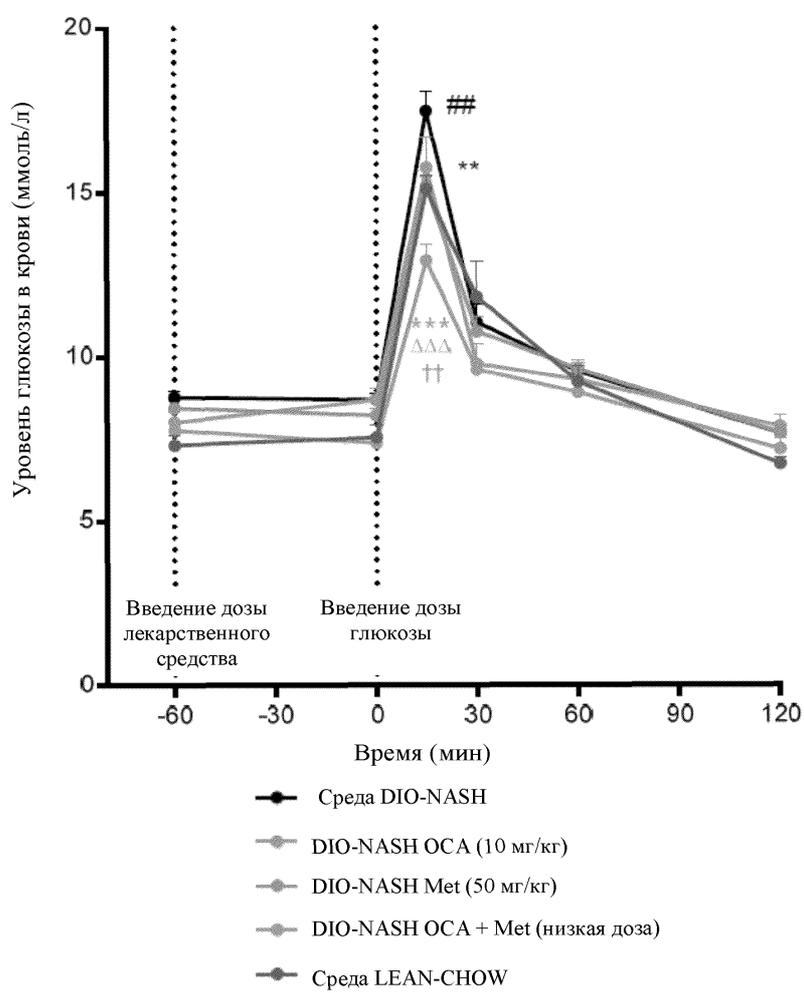
Фиг. 8D



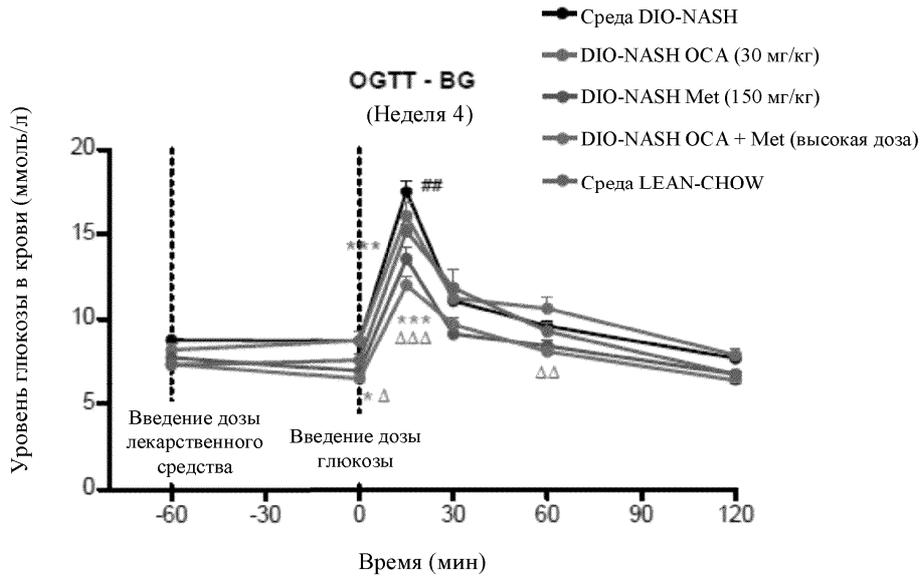
Фиг. 9А



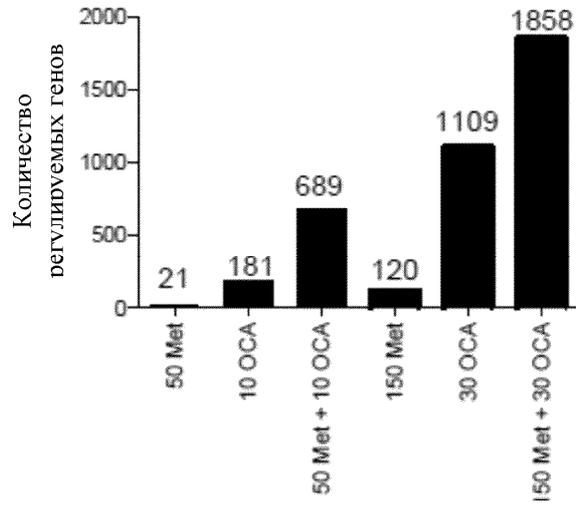
Фиг. 9В



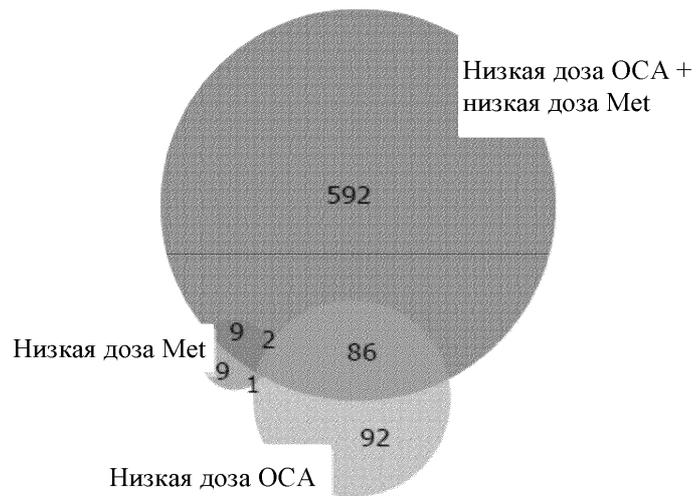
Фиг. 10А



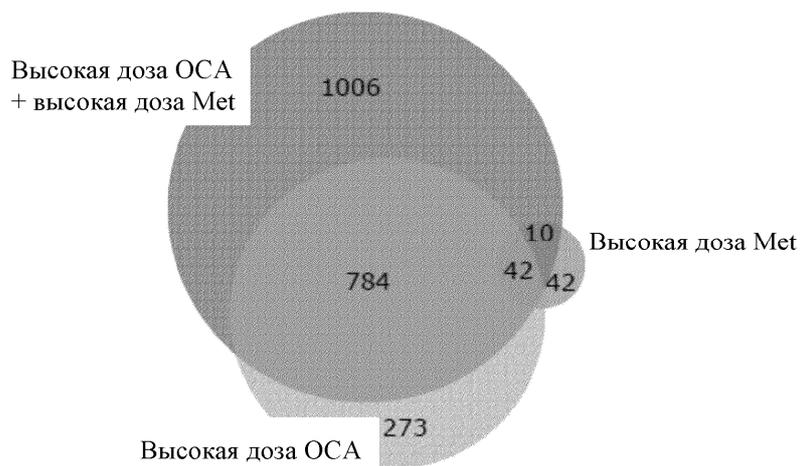
Фиг. 10В



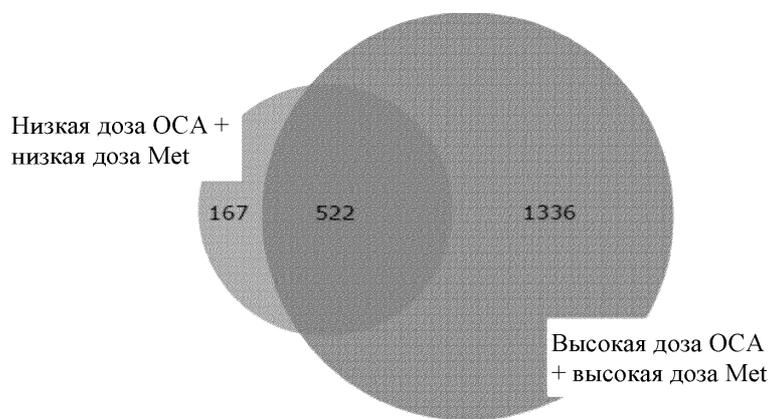
Фиг. 11



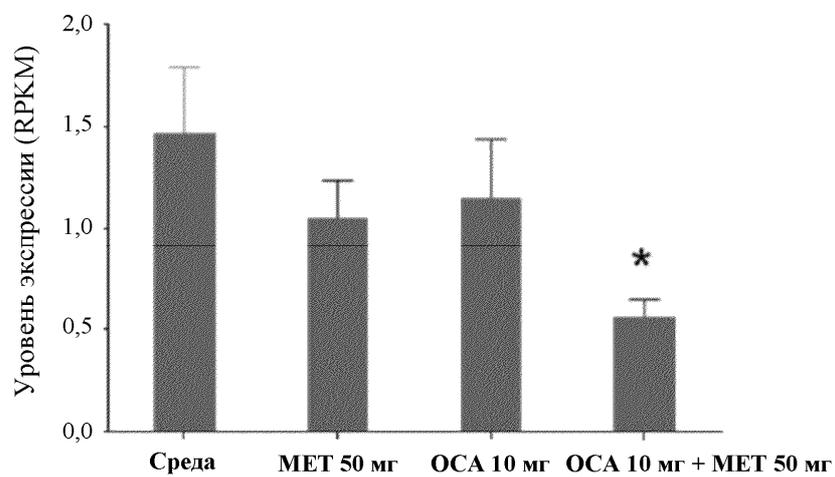
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 13А

