

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041166**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.21

(21) Номер заявки
201991990

(22) Дата подачи заявки
2018.02.23

(51) Int. Cl. **A61K 31/4178** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 17305213.5**(32) 2017.02.24****(33) EP****(43) 2020.04.07****(86) PCT/EP2018/054588****(87) WO 2018/154081 2018.08.30**

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

(72) Изобретатель:
**Декам Эмелин, Вальчак Роберт,
Беланже Кароль, Ноэль Бенуа (FR)**

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

(56) WO-A1-2016040860
WO-A1-2011064350
WO-A1-2017048322

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации, содержащей агонист PPAR и (S,E)-8-(4-(2-бутоксietокси)фенил)-1-(2-метилпропил)-N-(4-(((1-пропил)-1H-имидазол-5-ил)метил)сульфинил)фенил)-1,2,3,4-тетрагидробензо[b]азоцин-5-карбоксамид, также известный как ценикривирок (CVC), или его производные, и ее применению. Комбинация может быть полезна в комбинированной терапии для лечения воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

041166**B1****041166****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим комбинациям, содержащим агонист PPAR и (S,E)-8-(4-(2-бутоксисетокси)фенил)-1-(2-метилпропил)-N-(4-(((1-пропил-1H-имидазол-5-ил)метил)сульфинил)фенил)-1,2,3,4-тетрагидробензо[b]азоцин-5-карбоксамид, также известный как ценикривирок (CVC), или его производные, и их применению в комбинированной терапии.

Уровень техники

Согласно Вашингтонскому руководству по медицинской терапии (31-е изд.; 2004; Lippincott Williams & Wilkins), заболевания печени можно разделить на различные группы, в частности вирусные заболевания, медикаментозные заболевания печени и алкоголь-индуцированные заболевания печени, иммуноопосредованные заболевания печени, метаболические заболевания печени, прочие заболевания, такие как неалкогольная жировая болезнь печени, и осложнения печеночной недостаточности (такие как молниеносная печеночная недостаточность или гепатоцеллюлярная карцинома).

В частности, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является распространенным заболеванием печени с гистологическими признаками алкоголь-индуцированной жировой болезни печени у людей, которые потребляют малое количество или не употребляют алкоголь (Yen M et al., 2007; Marchesini G et al., 2003). НАЖБП обусловлена аномальным удержанием липидов в клетках (обычно называемых стеатозом), событие чаще встречающееся в печени, поскольку главным образом этот орган отвечает за метаболизм липидов. НАЖБП имеет спектр гистологических форм, включая стеатоз печени и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), который характеризуется воспалением печени, стеатозом, некрозом и фиброзом из-за разрушения клеток печени. Состояния, ассоциированные с НАЖБП, разнообразны и включают диабет типа 2, ожирение, дислипидемию, метаболический синдром, лечение гепатотоксичными препаратами, токсинами, инфекционными агентами или воздействие других экзогенных факторов.

Хотя НАЖБП обычно имеет доброкачественное, непрогрессирующее клиническое течение, НАСГ является потенциально серьезным заболеванием; до 25% пациентов могут быть поражены прогрессирующим фиброзом, циррозом и могут иметь осложнения при портальной гипертензии, печеночной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциноме, что свидетельствует о необходимости ранней и правильной оценки (Yen M et al., 2007).

Средства для эффективного лечения фиброзных заболеваний печени, в частности НАЖБП и НАСГ, все еще недостаточны. Для пациентов с НАСГ все еще отсутствует установленное лечение, и в клинических испытаниях опробовано несколько клинических вариантов (Vuppalanchi R and Chalasani N, 2009; Dowman J.K et al., 2009). Эти исследования включают использование многих различных семейств химических соединений (фибратов, тиазолидиндионов, бигуанидов, статинов, каннабиноидов) и терапевтических мишеней (ядерных рецепторов, рецепторов ангиотензина, каннабиноидных рецепторов, редуктазы HMG-CoA). Недавно исследования с использованием тиазолидиндионов (росиглитазон и пиоглитазон) показали, что эти препараты могут улучшать состояние печени, но лечение этими препаратами не обходится без нежелательных эффектов, таких как повышенный риск застойной сердечной недостаточности и остеопороза, а также увеличение массы тела с оказанием психологического воздействия на пациента (Dowman JK et al., 2010; Shiri-Sverdlov R et al., 2006; Neuschwander-Tetri et al., 2003). Клинические испытания, включающие введение каннабиноидов, выявили проблему, связанную с нервно-психическими нарушениями (Vuppalanchi R and Chalasani N, 2009). В других методах лечения, применяемых в настоящее время, предпринимаются попытки определить лекарственные вещества для применения при НАСГ в качестве антиоксидантов, но ни один из этих методов лечения пока не дал убедительных результатов (Nelson A et al., 2009).

Несколько соединений с различными механизмами действия в настоящее время проходят клиническое испытание фазы 2 или 3.

1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-он (элафибранор или ELA, ранее известный как GFT505), двойной агонист PPAR-альфа/дельта, описанный в WO2004005233 обладает свойствами, которые могут быть полезны для лечения ряда заболеваний, включая фиброзные расстройства, гастроэнтерологические заболевания и заболевания печени, в частности холестатические заболевания, такие как первичный желчный холангит (РВС) и ПСХ (первичный склерозирующий холангит), или заболевания печени, в частности неалкогольные жировые болезни печени (НАЖБП), такие как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Элафибранор оценивали в отношении клинической эффективности при НАСГ в однолетнем исследовании фазы 2b, основанном на биопсии печени (GFT505-2127), одном из крупнейших интервенционных исследований, когда-либо проводившихся в отношении НАСГ. На сегодняшний день более чем у 800 пациентов и здоровых добровольцев элафибранор продемонстрировал полезные свойства в отношении НАСГ, включая, в частности, улучшение маркеров дисфункции печени, включая ALAT, ASAT, γ GT, ALP; улучшение чувствительности к инсулину и гомеостаза глюкозы; благоприятное воздействие на липиды плазмы, в том числе снижение уровней триглицеридов и ХС-ЛПНП в плазме, а также повышение уровня ХС-ЛПВП; противовоспалительные свойства; эффективность по гистологическим параметрам НАСГ (стеатоз, воспаление, фиброз) на моделях болезней животных - антифиброзная активность; и отсутствие проблем с безопасностью было подтверждено в 2-летнем исследовании канцерогенности с полным набором токсикологических тестов. В настоя-

шее время элафибранор проходит испытание в клиническом исследовании фазы 3 в отношении лечения НАСГ. Также начали проводить оценку применимости этого вещества для лечения РВС в клиническом испытании фазы 2.

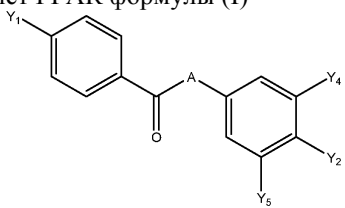
CVC, двойной антагонист CCR2/5, является другим соединением, которое было предложено для лечения НАСГ или фиброза печени. Ранее CVC оценивали в исследовании CENTAUR фазы 2b для лечения НАСГ у взрослых пациентов с фиброзом печени, при этом основным результатом лечения считали минимальное, на 2 балла, улучшение по шкале NAS, сопровождаемое уменьшением либо лобулярного воспаления, либо гепатоцеллюлярного баллонирования как минимум на 1 балл после одного года лечения 150 мг дозой CVC, вводимой перорально один раз в сутки каждое утро с едой. Однако основной результат не был достигнут. В ходе исследования были получены данные, свидетельствующие об уменьшении фиброза у определенной доли пациентов, получавших CVC, по сравнению с плацебо. Как следствие, в настоящее время выполняют оценку эффективности CVC для лечения фиброза печени у пациентов с НАСГ в исследовании AURORA, фаза 3, основной конечной точкой которого является улучшение фиброза через 12 месяцев как минимум на 1 стадию (согласно системе NASH CRN) без ухудшения стеатогепатита и улучшенные показатели по сравнению с плацебо по совокупной оценке в конечной точке гистопатологического прогрессирования до цирроза, связанных с печенью клинических исходов и общей смертности.

За развитие НАСГ отвечают несколько механизмов, но нет никакой информации, обеспечивающей понимание того, какие комбинации продуктов позволили бы эффективно улучшить терапию НАСГ. Настоящее изобретение относится к такому неожиданному улучшению.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему:

- (i) CVC или аналог, его фармацевтически приемлемую соль или сольват, и
- (ii) по меньшей мере один агонист PPAR формулы (I)



в которой:

Y_1 представляет собой галоген, группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу $CH=CH$ или CH_2-CH_2 ;

Y_2 представляет собой группу Gb-Rb;

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

Ra представляет собой атом водорода, незамещенную (C_1-C_6)алкильную группу, (C_6-C_{14})арильную группу или (C_1-C_6)алкильную группу, которая замещена одним или более атомами галогена, (C_1-C_6)алкокси или (C_1-C_6)алкилтио группу, (C_3-C_{14})циклоалкильную группу, (C_3-C_{14})циклоалкилтио группы или гетероциклические группы;

Rb представляет собой (C_1-C_6)алкильную группу, замещенную по меньшей мере -COORc группой, где

Rc представляет собой атом водорода или (C_1-C_6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или более атомами галогена, (C_3-C_{14})циклоалкильные группы или гетероциклические группы; и

Y_4 и Y_5 , одинаковые или разные, представляют собой (C_1-C_6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или более атомами галогена, (C_3-C_{14})циклоалкильные группы или гетероциклические группы.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) комбинации представляет собой CVC или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один агонист PPAR представляет собой 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-он (элафибранор или ELA, ранее известный как GFT505).

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения комбинированный продукт по изобретению содержит CVC и элафибранор.

Кроме того, комбинированный продукт по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, выбранный из пирфенидона или ингибиторов активности рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и других RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого антифибротического соединения, восприимчивого к нарушению сигнальных путей, активируемых TGF β и BMP, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β I типа (TGFBR1) или II типа

(TGFBRII) и их лиганды, такие как TGFβ, активин, ингибин, Nodal, анти-мюллеровый гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты канонического SMAD-зависимого пути, включая регуляторные или ингибиторные SMAD-белки или члены SMAD-независимых или неканонических путей, в том числе различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, сигнальные пути Rho-подобных ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, процесса TGFβ-индуцированного EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены путей WNT или Notch, которые чувствительны к влиянию TGFβ.

Альтернативно, комбинированный продукт по изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один терапевтически активный агент, выбранный из JAK/STAT ингибиторов и других противовоспалительных агентов и/или иммунодепрессантов. Например, терапевтически активный агент может быть выбран из глюкокортикоидов, НПВП, циклофосфида, нитрозомочевин, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пурина, аналогов пиримидина, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов сфингозин-1-фосфатного рецептора, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, T-клеточный рецептор и интегрины.

Комбинированный продукт по изобретению может быть в форме фармацевтической композиции или набора компонентов. Компоненты комбинации изобретения, если они представлены в форме набора компонентов, могут вводиться одновременно, последовательно и отдельно.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическому применению комбинированного продукта по настоящему изобретению. Как таковое, изобретение также относится к комбинированному продукту, раскрытому в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства.

Комбинированный продукт по изобретению полезен, в частности, для лечения или профилактики заболеваний, таких как иммунные (например, аутоиммунные), воспалительные, метаболические, фиброзные и холестатические заболевания. Соответственно, изобретение относится к комбинированному продукту по изобретению для применения в способе лечения иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания. Помимо этого, изобретение относится к применению комбинированного продукта по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания. Изобретение также относится к способу лечения иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества комбинированного продукта по изобретению.

В конкретном варианте осуществления заболевание выбирают из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), медикаментозных заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронической холангиопатии, такой как первичный склерозирующий холангит (ПСХ), первичный желчный холангит (РВС), билиарной атрезии, семейного внутрипеченочного холестаза типа 3 (PFIC3), воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, келоида, старого инфаркта миокарда, склеродермия/системного склероза, воспалительных заболеваний, нейродегенеративных заболеваний, разных видов рака, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, менингиомы, связанной с нейрофиброматозом, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, экзокринных опухолей поджелудочной железы, лейкемии, миелопролиферативных/миелодиспластических заболеваний, мастоцитоза, дерматофибросаркомы, солидных опухолей, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или ободочной и прямой кишки, рака предстательной железы, фиброза или цирроза печени любого происхождения, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированного фиброза или цирроза, НАСГ-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, медикаментозного фиброза или цирроза печени, инфекционного фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, бактериального фиброза или цирроза печени, вирусного фиброза или цирроза, фиброза или цирроза печени, вызванного HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванной смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза, индуцированного лучевой или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени, вызванного любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброза кишечника любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, фиброза тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза кожи, фиброза эпи-

дермиса, фиброза эндодермы, фиброза кожи вследствие склеродермии/системного склероза, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF), фиброза сердца, фиброза почек, нефрогенного системного фиброза, фиброза мышц, фиброза мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброза костного мозга, фиброза суставов, фиброза сухожилий, фиброза хряща, фиброза поджелудочной железы, фиброза матки, фиброза нервной системы, фиброза яичка, фиброза яичников, фиброза надпочечников, фиброза артерий, фиброза вен, фиброза глаз, эндомикардиального фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, прогрессирующего массивного фиброза (осложнения пневмокониоза шахтеров), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, перимплантационного фиброза и асбестоза, артрофиброза, спаечного капсулита.

В еще одном конкретном варианте осуществления заболевание выбирают из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), медикаментозных заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертонии, хронической холангиопатии, такой как первичный склерозирующий холангит (ПСХ), первичный желчный холангит (РВС), атрезии желчевыводящих путей, семейного внутрипеченочного холестаза типа 3 (PFIC3), воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированного фиброза или цирроза, НАСГ-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, медикаментозного фиброза или цирроза печени, инфекционного фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, бактериального фиброза или цирроза печени, вирусного фиброза или цирроза, фиброза или цирроза печени, вызванного HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза, индуцированного лучевой или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени, вызванного любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброза желудочно-кишечного тракта любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, фиброза тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, легочного фиброза, идиопатического легочного фиброза (IPF).

Композиции и способы по настоящему изобретению решают неудовлетворенные потребности в лечении или профилактике таких заболеваний.

Описание чертежей и таблиц

Сокращения, используемые на чертежах, в таблицах и в тексте:

α-SMA: альфа-гладкомышечный актин,
 BMP: костный морфогенетический белок,
 кДНК: комплементарная дезоксирибонуклеотидная кислота,
 COL1A1: коллаген, тип 1, альфа 1,
 CDAA: холин-дефицитная L-аминокислота,
 CSAA: дополненная холином L-аминокислота,
 SVC: ценикривирок,
 ДМСО: диметилсульфоксид,
 ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота,
 DTT: дитиотреитол,
 ELA: элафибранор или GFT 505,
 ИФА: иммуноферментный твердофазный анализ,
 EMT: эпителиально-мезенхимальный переход,
 EOB: приращение по Блисссу,
 FBS: фетальная бычья сыворотка,
 FDA: управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств,
 FPP: фарнезилпирофосфат,
 GDF: факторы дифференциации роста,
 Hh: Hedgehog,
 GGPP: геранилгеранлпирофосфат,
 HMG-CoA: 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А,
 hHSC: звездчатые клетки печени человека,
 HSC: звездчатые клетки печени,

IC₅₀: половинная максимальная ингибирующая концентрация,
 InMyoFib: кишечные миофибробласты,
 LBD: лиганд-связывающий домен,
 MMP2: матричная металлопептидаза-2,
 MMP9: матричная металлопептидаза-9,
 мкл: микролитр,
 ЛПНП: липопротеины низкой плотности,
 NHLF: нормальные фибробласты легких человека,
 PBS: фосфатно-солевой буфер,
 PFOR: пируват ферредоксин оксидоредуктаза,
 PPAR: рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами,
 PPARE: PPAR элементы ответа,
 кПЦР: количественная полимеразная цепная реакция,
 pMol: пмоль,
 rhFGF: рекомбинантный человеческий основной фактор роста фибробластов,
 РНК: рибонуклеиновая кислота,
 RT: обратная транскриптаза,
 SmBM: минимальная среда для клеток гладких мышечных волокон,
 SteCGS: добавка для роста звездчатых клеток,
 SteCM: среда для звездчатых клеток,
 TGFβ1: фактор роста опухоли бета-1,
 TGFβRI: рецептор TGFβ I типа,
 TGFβRII: рецептор TGFβ II типа,
 THBS1: тромбоспондин 1,
 ТМБ: тетраметилбензидин.

Фиг. 1: дифференциальный антифибротический эффект элафибранора по сравнению с эффектом ценикривирока и безафибрата в TGFβ-индуцированных hHSC.

Выделенные из сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с элафибранором (А), ценикривироком (В) или безафибратом (пан-агонистов PPAR α/γ/δ) перед активацией профиброгенным цитокином TGFβ1 (1 нг/мл).

Через 48 ч инкубации экспрессию α-SMA измеряли с методом ИФА.

Полученные значения трансформировали в процент ингибирования относительно контроля TGFβ1. Данные представлены в виде среднего (четыре значения) ± стандартное отклонение (SD).

Статистический анализ проводили с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующими апостериорными тестами Бонферрони с помощью программного обеспечения Sigma Plot 11.0. [*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 (сравнение с группой 1 нг/мл TGFβ1)]. Подгонку кривой и расчет половины максимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) выполняли с помощью программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

Фиг. 2: комбинация элафибранора с ценикривирока синергически ингибирует α-SMA в TGFβ1-индуцированных hGSC.

Комбинации тестировали в формате доза-ответ, представленном в табличном виде, и анализировали избыток по модели аддитивизма Блисса (ЕОВ). Готовили серии разведений элафибранора (ряд) и ценикривирока (столбец), включая их соответствующие контроли в ДМСО. Полученные смеси добавляли к выделенным из сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGFβ1 (1 нг/мл).

(А) Процент ингибирования α-SMA по сравнению с контролем TGFβ1 для всех пар комбинаций. Данные представлены в виде среднего четырех значений.

(В) ЕОВ баллы рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений со значениями ЕОВ>10 считалась синергетической (от светло-серого до черного). Также рассчитывали общий балл ЕОВ, включая все комбинации.

(С) Значения данных, полученные из пары синергетических комбинаций, представляли в виде гистограммы. Данные представлены в виде среднего (четыре значения) ± стандартное отклонение (SD). *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 с использованием t-критерия Стьюдента для сравнения группы комбинаций с самым высоким эффектом, обеспечиваемым одним агентом.

Фиг. 3: безафибрат не дает синергетического эффекта в комбинации с элафибранором в отношении уменьшения фиброза в TGFβ1-индуцированных hGSC.

Комбинации тестировали в формате доза-ответ, представленном в табличном виде, и анализировали избыток по модели аддитивизма Блисса. Готовили серии разведений безафибрата (ряд) и ценикривирока (столбец), включая их соответствующие контроли в ДМСО. Полученные смеси добавляли к выделенным из сыворотки HSC за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGFβ1 (1 нг/мл). (А) Процент ингибирования α-SMA относительно контроля TGFβ1. (В) Избыток по баллам Блисса (ЕОВ) рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любую пару соединений со значениями ЕОВ>10 считали

синергетической (от светло-серого до черного). Также рассчитывали общий балл EOB, включая все комбинации. (C) Значения данных, полученные из наиболее эффективной пары комбинации, представляли в виде гистограммы. Данные представлены в виде среднего (четыре значения) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Ns - статистически незначимый согласно t-критерию Стьюдента, использованному для сравнения группы комбинаций с самым высоким эффектом, обеспечиваемым одним агентом.

Фиг. 4: влияние элафибранора (GFT505 3 мг/кг/сутки), CVC (10 мг/кг/сутки) и их комбинации на НАСГ-связанные параметры у мышей, получавших CDFP.

Активность заболевания оценивали по шкале NAS (сумма степеней стеатоза, баллонного и лобулярного воспаления) (A). Поражение печени оценивали по (B) концентрации СК18-M30 в плазме (маркер апоптоза) и концентрации AST (C) в плазме (маркеры цитолиза). Данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ с использованием критерия Крускала-Уоллиса и нескорректированного апостериорного теста Данна. □ $p < 0,05$, □□ $p < 0,01$, □□□ $p < 0,001$ с использованием одностороннего t-критерия Стьюдента с поправкой Уэльса. HSA, модель одного агента с самым высоким эффектом.

Фиг. 5: влияние элафибранора (GFT505 3 мг/кг/сутки), CVC (10 мг/кг/сутки) и их комбинации на экспрессию генов, участвующих в фиброзе, ремоделировании ткани и воспалении у мышей, получавших CDFP.

Экспрессию α -SMA, TGF β 1, Coll α 1, Coll α 2 TIMP1 (фиброгенез) и MMP2 (ремоделирование ткани), а также TNF α и MCP1 (воспаление) оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени. Данные выражали в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение, □ $p < 0,05$, □□ $p < 0,01$, □□□ $p < 0,001$ с использованием одностороннего t-критерия Стьюдента с поправкой Уэльса. HSA, модель одного агента с самым высоким эффектом.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными продуктами, способами, условиями или параметрами, описанными и/или показанными в настоящем описании, и что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена для описания конкретных вариантов осуществления только в качестве примеров и не является предназначенной для ограничения заявленного изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Приведенные ниже термины и сокращения имеют определенные ниже значения, если не указано иное.

В настоящем раскрытии формы единственного числа включают ссылку на множественное число, а указание конкретного числового значения включает, по меньшей мере, это конкретное значение, если из контекста в явном виде не следует иное. Таким образом, например, указание "растворитель" является указанием специалисту в данной области на наличие одного или более таких растворителей и их эквивалентов, и т.д.

Как использовано выше, термин "заболевание" относится к заболеванию, расстройству, состоянию, симптому или показанию. Этот термин используется взаимозаменяемо с фразой "заболевание или расстройство".

Используемые в настоящем описании термины "лечение" или "терапия" (а также различные формы этих слов) включают профилактическое (например, превентивное), лечебное или паллиативное лечение. Такое профилактическое, лечебное или паллиативное лечение может быть полным или частичным. Например, полное устранение нежелательных симптомов или частичное устранение одного или более нежелательных симптомов будет представлять собой "лечение" согласно тому, как предусмотрено в настоящей заявке.

Используемый выше и далее в тексте термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения целевого результата при лечении соответствующего расстройства, состояния или побочного эффекта. Понятно, что эффективное количество компонентов по настоящему изобретению будет меняться от пациента к пациенту не только в зависимости от конкретного выбранного соединения, компонента или композиции, способа введения и способности компонентов вызывать целевой ответ у индивидуума, но также в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние или тяжесть состояния, подлежащего облегчению, уровня гормонов, возраста, пола, веса индивидуума, состояния пациента и тяжести состояния, подвергаемого лечению, одновременно вводимого лекарственного средства или специальной диеты, которой придерживается конкретный пациент, и других факторов, как известно специалистам в данной области техники, соответствующая дозировка, в конечном счете, определяется лечащим врачом. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения улучшенного терапевтического ответа. Эффективным количеством является также количество, при котором терапевтически полезный эффект преобладает над любым токсическим или вредным эффектом компонентов.

"Фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского заключения пригодны для контакта с тканями людей и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других осложнений, и находятся в пределах разумного соотношением пользы/риска.

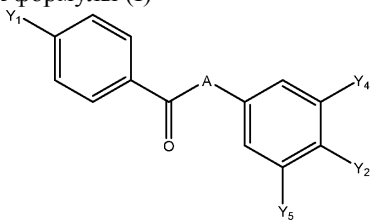
"Соль" и "фармацевтически приемлемая соль" включают аддукты кислоты и основания. "Аддукт кислоты" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований, которые не являются биологически или иным образом нежелательными и которые образуются с неорганическими кислотами и органическими кислотами. "Аддукт основания" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных кислот, которые не являются биологически или иным образом нежелательными, и которые получают путем добавления неорганического основания или органического основания к свободной кислоте. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, без ограничения, аддукты остатков оснований, таких как амины, с минеральными или органическими кислотами; соли остатков кислоты с щелочами или органическими соединениями; и т.п., или комбинацию, содержащую одну или более из вышеуказанных солей. Фармацевтически приемлемые соли включают соли и четвертичные аммониевые соли активного агента. Например, кислотные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п.; другие приемлемые неорганические соли включают соли металлов, такие как натриевая соль, калиевая соль, цезиевая соль и т.п.; и соли щелочно-земельных металлов, такие как соль кальция, соль магния и т.п., или комбинацию, включающую одну или более вышеупомянутых солей. Фармацевтически приемлемые органические соли включают соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, палмовая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, мезиловая, эзилная, бесиловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изетионная, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n равно 0-4, и т.п.; соли органических аминов, такие как соль триэтиламина, соль пиридина, соль пикколина, соль этаноламина, соль триэтаноламина, соль дициклогексиламина, соль N,N' -дибензилэтилендиамина и т.п.; и соли аминокислот, такие как аргинат, аспаргинат, глутамат и т.п.; или комбинацию, включающую одну или более из вышеуказанных солей.

"Сольват" означает комплекс, образованный сольватацией (объединением молекул растворителя с молекулами или ионами активного агента, реализованным в настоящем изобретении), или агрегат, который состоит из растворенного иона или молекулы (активного агента, реализованного в настоящем изобретении) с одной или более молекулами растворителя. В настоящем изобретении предпочтительным сольватом является гидрат.

"Фармацевтическая композиция" относится к композиции соединения по настоящему изобретению и среде, общепринятой в данной области для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например людям. Такая среда включает все фармацевтически приемлемые носители, разбавители или наполнители.

"Введение" включает любой способ введения, такой как пероральный, подкожный, подязычный, трансмукозальный, парентеральный, внутривенный, внутриартериальный, буккальный, сублингвальный, местный, вагинальный, ректальный, глазной, ушной, назальный, ингаляционный, внутримышечный, внутрикостный, интратекальный и трансдермальный или их комбинацию. "Введение" также может включать назначение или заполнение рецепта для приобретения лекарственной формы, содержащей конкретное соединение. "Введение" может также включать предоставление указаний относительно осуществления способа, включающего конкретное соединение или лекарственную форму, содержащую это соединение.

Настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему (i), по меньшей мере, CVC или его производное, или аналог, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, (ii), по меньшей мере, агонист PPAR формулы (I)



в которой:

Y_1 представляет собой галоген, группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу $\text{CH}=\text{CH}$ или CH_2-CH_2 ;

Y_2 представляет собой группу Gb-Rb;

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

Ra представляет собой атом водорода, незамещенную (C_1-C_6)алкильную группу, (C_6-C_{14})арильную

группу или (C₁-C₆)алкильную группу, которая замещена одним или более атомами галогена, (C₁-C₆)алкокси или (C₁-C₆)алкилтио группу, (C₃-C₁₄)циклоалкильные группы, (C₃-C₁₄)циклоалкилтио группы или гетероциклические группы;

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

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

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (I):

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

A представляет собой группу CH=CH;

Y₂ представляет собой группу Gb-Rb;

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

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

Rb представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу, замещенную группой -COOR₃, где

Rc представляет собой атом водорода или алкильную группу, имеющую от одного до четырех атомов углерода; и

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

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (I):

Y₁ представляет собой группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу CH₂-CH₂;

Y₂ представляет собой группу Gb-Rb;

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

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

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

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

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (I):

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

A представляет собой группу CH₂-CH₂;

Y₂ представляет собой группу Gb-Rb;

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

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

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

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

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

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (I) Y₁ представляет собой (C₁-C₆)алкилтио группу, содержащую (C₁-C₆)алкильную группу, которая является линейной или разветвленной, которая замещена или не замещена одним или более атомами галогена.

В конкретном варианте осуществления соединения формулы (I) выбирают из группы, состоящей из 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она (элафибранор или GFT505), 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонил-

диметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксиоксифенил]проп-2-ен-1-она, 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксопропил]фенокси]-2-метилпропановой кислоты и изопропилового эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксопропил]фенокси]-2-метилпропановой кислоты.

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

CVC представляет собой (S)-8-[4-(2-бутоксизтокси)фенил]-1-изобутил-N-[4-[[[1-пропил-1H-имидазол-5-ил)метил]сульфинил]фенил]-1,2,3,4-тетрагидро-1-бензозин-5-карбоксамид. Более подробно состав вещества ценикривирока раскрыты в публикации заявки на патент США № 2012/0232028. Родственные составы более подробно раскрыты в заявке на патент США № 61/823766, которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки для всех целей. В одном из вариантов осуществления CVC находится в форме аддукта кислоты. В конкретном варианте осуществления аддукт CVC включен в комбинированный продукт, такой как мезилат CVC, например монометансульфоноат (S)-8-[4-(2-бутоксизтокси)фенил]-1-изобутил-N-[4-[[[1-пропил-1H-имидазол-5-ил)метил]сульфинил]фенил]-1,2,3,4-тетрагидро-1-бензозин-5-карбоксамид. В одном из вариантов осуществления мезилат CVC представляет собой кристаллический материал, такой как бледно-зеленовато-желтый кристаллический порошок. В одном из вариантов осуществления мезилат CVC является хорошо растворимым в ледяной уксусной кислоте, метаноле, бензиловом спирте, диметилсульфоксиде и N,N-диметилформамиде; растворимым в пиридине и уксусном ангидриде; и умеренно растворимым в 99,5% этаноле; слабо растворимым в ацетонитриле, 1-октаноле и тетрагидрофуране; и практически нерастворимым в этилацетате и диэтиловом эфире. В одном из вариантов осуществления мезилат CVC является хорошо растворимым в водном растворе при pH от 1 до 2; умеренно растворимым при pH 3 и практически нерастворимым при pH от 4 до 13 и в воде.

В конкретном аспекте изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему:

- (i) CVC или его производное, или аналог, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват,
- (ii) агонист PPAR, в частности соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, в частности, элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт представляет собой композицию, содержащую:

- (i) CVC или его производное, или аналог, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват,
- (ii) агонист PPAR, в частности соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, в частности, элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль; а также
- (iii) фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт представляет собой набор компонентов, включающий:

- (i) CVC или его производное, или аналог, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват,
 - (ii) агонист PPAR, в частности соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, в частности, элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль;
- для последовательного, раздельного или одновременного применения, в частности при лечении любого из заболеваний, указанных в настоящем описании.

Согласно варианту осуществления комбинированный продукт содержит (i) CVC или его фармацевтически приемлемую соль и (ii) элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.

Изобретение также относится к комбинированному продукту, определенному в настоящем описании, для использования в способе лечения заболевания, такого как иммунное (например, аутоиммунное), воспалительное, метаболическое, фиброзное или холестатическое заболевание.

В дополнительном аспекте изобретение относится к комбинированному продукту по изобретению, предназначенному для применения для ингибирования пролиферации и/или активации фибробластов, ответственных за выработку коллагеновых волокон и/или ответственных за выработку внеклеточного матрикса.

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

Термин "воспаление" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате защитного ответа, включающего клетки-хозяева, кровеносные сосуды и белки и другие медиаторы, которые могут служить для устранения причины повреждения клеток/тканей, а также некротических клеток/тканей, образующихся в результате первичного инсульта, и инициации процесса репарации. Воспалительная реакция может проявляться в виде боли, жара, покраснения, отека, расширения кровеносных сосудов, усиления кровотока и потери функции.

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

Согласно настоящему изобретению фиброз может представлять собой фиброз любого органа или ткани. Иллюстративные, не ограничивающие примеры фиброза конкретного органа включают фиброз

печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичка, яичников, надпочечников, артерии, вены, толстой кишки, кишечника (например, тонкой кишки), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка.

В предпочтительном варианте осуществления фиброзное расстройство выбирают из группы, состоящей из фиброза печени, желудочно-кишечного тракта, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, кишечника и сустава (например, коленного сустава, плечевого или других суставов).

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

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предназначенное для лечения фиброзное расстройство выбирают из группы, состоящей из следующего неполного списка фиброзных расстройств: неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), легочного фиброза, идиопатического легочного фиброза, фиброза кожи, фиброза глаз, эндомикардиального фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, прогрессирующего массивного фиброза (осложнение пневмокониоза у шахтеров), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза легких, вызванный хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей (ХОБЛ, астма, туберкулез легких, эмфизема, курение, IPF), алкоголь-индуцированного или медикаментозного фиброза печени, цирроза печени, инфекционного фиброза печени, фиброза, индуцированного лучевой или химиотерапией, системного фиброза печени, болезни Крона, язвенного колита, келоида, старого инфаркта миокарда, склеродермии/системного склероза, артрофиброза, некоторых форм спаечного капсулита, хронической фиброзной холангиопатии, такой как первичный склерозирующий холангит (ПСХ) и (РВС), билиарной атрезии, семейного внутрипеченочного холестаза типа 3 (PFIC3), перимплантационного фиброза и асбестоза.

Холестаз определяют как уменьшение потока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами (гепато-клеточный холестаз) или обструкции потока желчи через желчные протоки внутри или вне печени (обструктивный холестаз). В клинической практике холестаз - это любое состояние, при котором отток желчи из печени замедлен или заблокирован.

Примеры воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний, заболеваний обмена веществ и холестатических заболеваний включают метаболические заболевания печени, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), медикаментозные заболевания печени, алкоголь-индуцированные заболевания печени, инфекционные заболевания печени, воспалительные заболевания печени, заболевания печени, опосредованные дисфункцией иммунной системы, дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания, рестеноз, синдром Х, метаболический синдром, диабет, ожирение, гипертонию, хроническую холангиопатию, такую как первичный склерозирующий холангит (ПСХ), первичный желчный холангит (РВС), атрезия желчевыводящих путей, семейный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, старый инфаркт миокарда, склеродермию/системный склероз, воспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания, разные виды рака, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, менингиому, связанную с нейрофиброматозом, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, экзокринные опухоли поджелудочной железы, лейкемию, миелопролиферативные/миелодиспластические заболевания, мастоцитоз, дерматофибросаркому, солидные опухоли, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или ободочной и прямой кишки, рак предстательной железы, фиброз или цирроз печени любого происхождения, фиброз или цирроз печени, вызванный метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированный фиброз или цирроз, НАСГ-индуцированный фиброз или цирроз, алкоголь-индуцированный фиброз или цирроз печени, медикаментозный фиброз или цирроз печени, инфекционный фиброз или цирроз печени, фиброз или цирроз печени, вызванный паразитарной инфекцией, бактериальный фиброз или цирроз печени, вирусный фиброз или цирроз, фиброз или цирроз печени, вызванный HBV-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный HCV-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный ВИЧ-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванный смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброз или цирроз, индуцированный лучевой или химиотерапией, фиброз желчных путей, фиброз или цирроз печени, вызванный любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброз кишечника любой этиологии, фиброз, вызванный болезнью Крона, фиброз, вызванный язвенным колитом, фиброз кишечника (например, фиброз тонкой кишки), фиброз толстой кишки, фиброз желудка, фиброз кожи, фиброз эпидермиса, фиброз эндодермы, фиброз кожи вследствие склеродермии/системного склероза, фиброз легких, фиброз легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF), фиброз сердца, фиброз почек, нефрогенный системный фиброз, фиброз мышц, фиброз мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброз костного мозга, фиброз суставов, фиброз сухожилий, фиброз хряща, фиброз поджелудочной железы, фиброз матки, фиброз нервной системы, фиброз яичка, фиброз яичников, фиброз надпочечников, фиброз артерий, фиброз вен, фиброз эндомикардиальный фиброз, фиброз средостения, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз

(осложнение пневмокониоза шахтеров), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, периплантационный фиброз и асбестоз, артрофиброз, спаечный капсулит.

Предпочтительно заболевание выбирают из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), медикаментозных заболеваний печени, алкоголь-индуцированных заболеваний печени, инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертонии, хронической холангиопатии, такой как первичный склерозирующий холангит (ПСХ), первичный желчный холангит (РВС), атрезии желчевыводящих путей, семейного внутрипеченочного холестаза типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированного фиброза или цирроза, НАСГ-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, медикаментозного фиброза или цирроза печени, инфекционного фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, бактериального фиброза или цирроза печени, вирусного фиброза или цирроза, фиброза или цирроза печени, вызванного HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза, индуцированного лучевой или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени, вызванного любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброза желудочно-кишечного тракта любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, фиброза тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF).

Следовательно, согласно изобретению лечение иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания включает введение комбинированного продукта по настоящему изобретению, например, в виде фармацевтической композиции или набора компонентов, содержащего компоненты (i) и (ii) комбинации, субъекту, имеющего указанное расстройство, для излечения, задержки, купирования или замедления прогрессирования расстройства, таким образом улучшая состояние пациента или здорового субъекта, в частности субъект, подверженного риску развития такого заболевания.

Подлежащий лечению субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека. Субъект, подлежащий лечению в соответствии с изобретением, может быть выбран на основе нескольких критериев, связанных с фиброзными заболеваниями, таких как предшествующее медикаментозное лечение, ассоциированные патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также на основе детектирования любого соответствующего биомаркера, который может быть оценен методами визуализации и иммунологическими, биохимическими, ферментативными, химическими методами или методами детектирования нуклеиновых кислот.

В конкретном варианте осуществления комбинированный продукт представляет собой набор компонентов, содержащий:

- (i) соединение CVC или его производное, аналог, соль или сольват,
 - (ii) агонист PPAR, в частности соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, в частности, элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль;
- для последовательного, раздельного или одновременного применения при лечении любого из упомянутых выше заболеваний.

Агонист PPAR формулы (I) может быть в форме фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла.

Агонист PPAR формулы (I) также может быть в форме гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла соли.

Согласно изобретению комбинацию, содержащую (i), по меньшей мере, CVC или его производное, аналог, соль или сольват, (ii), по меньшей мере, агонист PPAR формулы (I) и (iii) необязательно один или более фармацевтически приемлемых носителей, выбирают таким образом, чтобы комбинация по изобретению обеспечивала синергетическое действие против иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания, в частности воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания. Такая синергия может быть определена в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники, такими как метод оценки избытка по Блисссу (ЕОВ), описанный в примерах. Таким образом, настоящее изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему CVC или его фармацевтически приемлемую соль и элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль, причем каждый из них находится в синергетическом количестве, при котором вызываемый ими терапевтический эффект лучше, чем терапевтический

эффект, обеспечиваемый каждым из этих соединений, вводимым по отдельности.

Изобретение также относится к способу лечения иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания.

Субъект, подлежащий лечению в соответствии с изобретением, может быть выбран на основе нескольких критериев, ассоциированных с иммунными (например, аутоиммунными), воспалительными, метаболическими, фиброзными и холестатическими заболеваниями, такими как предшествующее медикаментозное лечение, ассоциированные патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также на основе любого другого соответствующего биомаркера, который можно оценить с помощью методов визуализации и иммунологического, биохимического, ферментативного, химического метода или метода детектирования нуклеиновых кислот.

В другом варианте осуществления комбинация по изобретению предназначена для одновременного, последовательного или раздельного введения в терапии, поэтому она может быть включена в различные композиции. В случае последовательного введения CVC или его производное, аналог, соль или сольват можно вводить до введения агониста PPAR формулы (I), предпочтительно элафибранора, или агонист PPAR формулы (I), предпочтительно элафибранор, вводят до CVC или его производных, или его аналога, или соли, или сольвата.

Комбинацию CVC или его производного, аналога, соли или сольвата; и агониста PPAR формулы (I), в частности элафибранора, можно приготовить в виде фармацевтически приемлемых нетоксичных солей CVC, его производного, аналога, соли или сольвата или агониста PPAR формулы (I), в частности элафибранора, полученных из органических или неорганических оснований или кислот. Эти соли могут быть получены во время конечной стадии очистки соединения или путем включения соли в предварительно очищенное соединение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие (i) CVC или его производное, соль или сольват; и (ii) агонист PPAR формулы (I), в частности элафибранор, также может содержать один или более наполнителей или носителей, фармацевтически приемлемых (например, солевые растворы, физиологические растворы, изотонические растворы и т.д., совместимые с фармацевтическим применением и хорошо известные специалисту в данной области).

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

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие CVC или его производное, аналог, соль или сольват; и (ii) агонист PPAR формулы (I), в частности элафибранор, можно вводить разными путями и в разных формах.

Например, соединение(я) может быть введено системным путем, per os, парентерально, путем ингаляции, с помощью назального спрея, назальной инстилляцией или инъекции, такой как, например, внутривенная инъекция, путем внутримышечного, подкожного, трансдермального, местного, внутриаортального введения и т.д.

Конечно, способ введения может быть адаптирован для формы CVC или его производного, аналога, соли или сольвата в комбинации с одним или более агонистами PPAR формулы (I), в частности элафибранора, в соответствии с процедурами, хорошо известными специалистами в данной области.

CVC или его производное, аналог, соль или сольват в комбинации с агонистом PPAR формулы (I), в частности с элафибранором, вводят в терапевтически эффективном количестве.

Частота и/или доза относительно введения может быть адаптирована специалистом в данной области техники в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, комбинацию (например, в форме фармацевтической композиции или набора компонентов) по настоящему изобретению можно вводить для лечения фиброзного заболевания в дозе соединения формулы (I), составляющей от 10 до 2000 мг/сутки, например от 50 до 1000 мг/сутки и, в частности, от 70 до 200 мг/сутки.

Доза CVC или его производного, аналога, соли, сольвата, сложного эфира и/или его пролекарства составляет от 10 до 1000 мг/сутки, например от 30 до 500 мг/сутки. В конкретном варианте осуществления CVC вводят в дозе, составляющей от 100 до 250 мг/сутки. В дополнительном конкретном варианте осуществления CVC вводят в дозе 150 мг/сутки. В еще одном конкретном варианте осуществления 150 мг CVC вводят перорально один раз в сутки, необязательно, каждое утро во время еды.

В конкретном варианте осуществления изобретения элафибранор вводят в дозе от 10 до 2000 мг/сутки. В еще одном конкретном варианте осуществления элафибранор вводят в дозе, составляющей от 70 до 200 мг/сутки, например от 80 до 120 мг/сутки. В другом варианте осуществления элафибранор

вводят в дозе 80 или 120 мг/сутки. В дополнительном конкретном варианте осуществления 80 или 120 мг элафибранора в сутки принимают каждое утро перед завтраком в виде двух таблеток, содержащих элафибранор, перорально, запивая стаканом воды.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения CVC используется в комбинации с элафибранором в дозе CVC, составляющей от 100 до 250 мг/сутки (например, 150 мг/сутки) и дозе элафибранора от 80 до 120 мг/сутки (например, 80 или 120 мг/сутки).

В другом предпочтительном варианте осуществления активные ингредиенты вводят в виде одной или более фармацевтических композиций в форме таблеток, предназначенных для перорального приема.

Введение может осуществляться ежедневно или даже несколько раз в сутки, при необходимости.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к комбинации по настоящему изобретению, дополнительно объединенной по меньшей мере с одним другим терапевтически активным агентом, таким как другие молекулы, обладающие известной противовоспалительной, антиметаболической, антифиброзной или антихолестатической активностью. Эта дополнительная комбинация по настоящему изобретению полезна для лечения воспалительных заболеваний, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

Согласно этому варианту осуществления комбинированный продукт по изобретению можно комбинировать с любым антифиброзным соединением, таким как пирфенидона или ингибиторов активности рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и других RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого антифибротического соединения, восприимчивого к нарушению сигнальных путей, активируемых TGF β и BMP, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β I типа (TGFBRI) или II типа (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, анти-мюллеровый гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты канонического SMAD-зависимого пути, включая регуляторные или ингибиторные SMAD-белки или члены SMAD-независимых или неканонических путей, в том числе различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, сигнальные пути Rho-подобных ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, процесса TGF β -индуцированного EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены путей WNT или Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .

Таким образом, изобретение также относится к фармацевтической композиции, в частности к ее применению в способе лечения фиброзного заболевания, содержащей (i) CVC или его производное, аналог, соль или сольват и (ii) один или более агонистов PPAR формулы (I) в комбинации по меньшей мере с одним терапевтически активным агентом с известной антифибротической активностью, выбранным из пирфенидона или ингибиторов активности рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и других RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого антифибротического соединения, восприимчивого к нарушению сигнальных путей, активируемых TGF β и BMP, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β I типа (TGFBRI) или II типа (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, анти-мюллеровый гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты канонического SMAD-зависимого пути, включая регуляторные или ингибиторные SMAD-белки или члены SMAD-независимых или неканонических путей, в том числе различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, сигнальные пути Rho-подобных ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, процесса TGF β -индуцированного EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены путей WNT или Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β , для использования в способе лечения фиброзного расстройства.

В другом конкретном варианте осуществления другие классы молекул, которые также могут быть объединены с CVC или его производным, аналогом, солью или сольватом и с одним или более агонистами PPAR формулы (I), включают JAK/STAT ингибиторов и другие противовоспалительные агенты и/или иммунодепрессанты. Неполный список этих агентов включает, без ограничения, глюкокортикоиды, НПВП, циклофосфамид, нитрозомочевину, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пурина, аналоги пиридина, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин, мириоцин, такролимус, сиролимус, производные микофеноловой кислоты, финголимод и другие модуляторы сфингозин-1-фосфатного рецептора, моноклональные и/или поликлональные антитела против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, T-клеточный рецептор и интегрин.

Другие классы молекул, которые также могут быть объединены с комбинированным продуктом по изобретению, включают молекулы, которые могут потенциально усиливать воздействие или эффект CVC или его производного, аналога, соли или сольвата и одного или более агонистов PPAR формулы (I).

В другом варианте осуществления CVC или его производное, аналог, соль или сольват и один или более агонистов PPAR формулы (I) вводят в виде отдельных активных ингредиентов.

Соответственно, изобретение также относится к фармацевтической композиции для применения в

способе лечения иммунного (например, аутоиммунного), воспалительного, метаболического, фиброзного или холестатического заболевания, содержащей (i) соединение, выбранное из CVC или его производного, аналога, соли или сольвата, и (ii) один или более агонистов PPAR формулы (I), где указанные (i) и (ii) являются единственными активными ингредиентами в композиции.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения иммунных (например, аутоиммунных), воспалительных заболеваний, метаболических, фиброзных или холестатических заболеваний, включающим введение комбинации по настоящему изобретению, в частности, в форме фармацевтической композиции или набора компонентов, содержащего CVC или его производное, или аналог, соль или сольват и один или более агонистов PPAR формулы (I).

Изобретение далее описано со ссылкой на приведенные ниже неограничивающие примеры.

Примеры.

Материалы и методы.

Оценка элафиранора, CVC и их комбинации на *in vitro* модели фиброгенеза печени.

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO, Fluka, кат. № 41640). CVC получали от CLINISCIENCES (ссылка: A13643-10, номер партии: 497223-25-3). Безафибрат синтезировали в Genfit.

Культура hHSC.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC; Innoprot) культивировали в среде STeCM (ScienCell, кат. № 5301), которую дополняли 2% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, ScienCell, кат. № 0010), 1% пенициллином/стрептомицином (ScienCell, кат. № 0503) и ростовой добавкой для звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, кат. № 5352). Колбы для культивирования клеток покрывали поли-L лизином (Sigma, кат. № P4707) для лучшей адгезии.

Приготовление композиций: матрица двухкомпонентной комбинации (CVC/агонист PPAR).

Матрица двухкомпонентной комбинации (CVC/элафибранор).

Ценикривирог (CVC) приобретали у компании CLINISCIENCES (Réf: A13643-10, номер CAS: 497223-25-3). Безафибрат и элафибранор (GFT505) синтезировали в Genfit.

Для этих экспериментов создавали матрицу в виде "шахматной доски". Готовили серийные разведения маточных растворов CVC и элафибранора в DMCO, причем готовили 5 серийных разведений на один ряд (элафибранор) и 6 серийных разведений на колонку (ценикривирог) 96-луночного планшета. Затем получали комбинационную матрицу 6×7 путем смешивания 1:1 всех концентраций одного агента. Тестовые концентрации для каждого соединения выбирали на основании соответствующего значения IC₅₀ для каждого соединения в виде одного агента, полученного путем измерения содержания α-SMA в модели TGF-β1-стимулированных HSC.

Матрица двухкомпонентной комбинации (CVC/безафибрат).

Безафибрат растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Fluka, кат. № 41640), и получали серийные разведения по 5 разведений на ряд (безафибрат) и 6 разведений на колонку (CVC) 96-луночного планшета. Затем получали комбинационную матрицу 6X7 путем смешивания 1:1 всех концентраций одного агента. Тестовые концентрации для каждого соединения выбирали на основании соответствующего значения IC₅₀ для каждого соединения в виде одного агента, полученного путем измерения содержания α-SMA в модели TGF-β1-стимулированных HSC.

Активация hHSC с помощью TGF-β1 и лечение соединением.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC; Innoprot) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем клетки высевали с плотностью 2×10⁴ кл./лунка в 96-луночные планшеты для измерения α-SMA методом ИФА.

На следующий день клеточную культуральную среду удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen кат. № 14190). hHSC выдерживали в течение 24 ч в бессывороточной среде, не содержащей SteCGS. Для обработки CVC, элафибранором, безафибратом и парными комбинациями CVC/элафибранор и CVC/безафибрат выполняли предварительную инкубацию hHSC в сыворотке крови в течение 1 ч с указанными соединениями с последующим добавлением профиброгенных стимуляторов TGF-β1 (PeproTech кат. № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной среде, не содержащей SteCGS, и инкубацией в течение дополнительных 48 ч.

α-SMA ИФА.

Уровень α-SMA измеряли с помощью сэндвич-ИФА. Вкратце, на поверхность лунок планшета ИФА сначала иммобилизовали антитело (мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в PBS+0,2% Твин 20 в течение одного часа добавляли блокирующий раствор, состоящий из PBS+0,2% BSA, после чего выполняли еще один цикл промывки. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом на 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки добавляли детектирующее антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) на 2 ч при комнатной температуре с последующими 3 промывками. Для обнаружения сначала наносили HRP-конъюгированный стрептавидин (R&D Systems, кат. № DY998) на 30 мин при комнатной температуре. После промывки добавляли субстрат HRB TMB (BD,

кат. № 555214) и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. При окислении ТМВ образуется водорастворимый синий продукт реакции, который желтеет при добавлении серной кислоты (остановка реакции), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм с помощью спектрофотометра. Полученный цвет прямо пропорционален количеству α -SMA, присутствующего в лизате.

Определение синергизма методом избытка по Блисссу (ЕОВ).

Значения α -SMA, полученные в анализах ИФА, сначала преобразовали в процент ингибирования относительно контроля TGF- β 1. Ингибирование выше 20% считалось биологически значимым. Затем, используя эти проценты ингибирования, определяли ЕОВ (избыток по Блисссу) для выявления синергетического эффекта комбинаций лекарств. Сначала определялся ожидаемый показатель аддитивности по Блисссу (Е) по формуле $E=(A+B)-(A \times B)$, где А и В - процент ингибирования, обеспечиваемый заданной дозой элафибранора (А) (или безафибрата) и ценикривикора (CVC) (В). Разница между ожидаемым значением по Блисссу и наблюдаемым ингибированием, обеспечиваемым комбинацией CVC/элафибранор (или безафибрат) в одной и той же дозе представляет собой балл "Избыток по Блисссу".

Балл "Избыток по Блисссу"=0 указывает на то, что комбинируемое лечение является аддитивным (согласно ожиданиям для эффектов при независимом введении);

балл "Избыток по Блисссу">0 указывает на активность, превышающую аддитивный эффект (синергизм); и

балл "Избыток по Блисссу"<0 означает, что эффект комбинации меньше аддитивного (антагонизм).

Для комбинаций элафибранор+CVC и безафибрат+CVC рассчитывали дополнительный общий балл по Блисссу путем суммирования всех ЕОВ.

Для подтверждения синергизма экспериментальные значения, соответствующие верхнему баллу ЕОВ для комбинации CVC/элафибранор, наносили на гистограмму.

Значимость наблюдаемых различий между CVC/элафибранор или CVC/элафибранор по сравнению с самым высоким значением для одного агента определяли с помощью t-критерия Стьюдента с * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Оценка элафибранора, CVC и их комбинации на модели продолжительной CDFF диеты (8 недель).

Профилактические действие одного элафибранора, одного CVC и их комбинации оценивали на модели фиброзирующего НАСГ у мышей, которых держали на CDAA диете+2% холестерина+30% молочного жира и кукурузном сиропе с высоким содержанием фруктозы 55 (55% фруктозы/45% глюкозы с конечной концентрацией 42 г/л) в питьевой воде (Mells et al. J Nutr Biochem 2015). Самцы мышей C57B1/6J в возрасте 5-6 недель находились на контрольной (CSAA) диете (n=4), диете CDFF (n=12) или диете CDFF, дополненной 3 мг/кг/сутки элафибранора, 10 мг/кг/сутки CVC или комбинированными препаратами (3 мг/кг/сутки элафибранора в комбинации с 10 мг/кг/сутки CVC) (n=8 на группу) в течение 8 недель.

Два раза в неделю регистрировали вес тела, потребление пищи и воды. В последний день лечения получали образцы плазмы из образцов крови из ретроорбитального синуса, и мышей умерщвляли после 6-часового голодания. Печень быстро извлекали для биохимического и гистологического анализа. Все процедуры на животных выполняли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных.

Гистология.

Заливка тканей и получение срезов.

Срезы печени фиксировали в 4%-ном растворе формалина. Затем кусочки печени промывали в течение 30 мин в PBS и обезвоживали в растворах этанола (последовательные ванны при 70, 80, 95 и 100% этаноле). Кусочки печени инкубировали в трех разных ваннах с ксилолом (Honeywell, кат. № 534056), а затем в двух ваннах с жидким парафином (59°C). Затем кусочки печени помещали в пробирки на штативе, которые аккуратно заполняли Histowax®, полностью покрывая ткань.

Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, вынимали из пробирок и хранили при комнатной температуре. Из блоков печени делали 3 мкм срезы.

Окрашивание гематоксилином/эозином/сафранином.

Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в течение 3 мин в гематоксиле Майера (Microm, кат. № F/C0303). Затем срезы печени промывали водой и инкубировали в течение 1 мин в 0,5%-ном спиртовом растворе Эозина Y (VWR, кат. № 1.02439.0500) и 0,5%-ном растворе эритрозина (VWR, кат. № 1.15936.0010) и промывали этанолом. Затем срезы инкубировали в течение 2 мин в сафранине и в конечном итоге обезвоживали и готовили препарат для исследования с использованием среды CV Mount (Leica, кат. № 046430011).

Гистологические исследования.

Специалист проводил гистологические исследования каждого образца печени слепым методом. Виртуальные слайды получали с помощью сканера 3D Histech Panoramic 250. Для каждого животного балл, суммирующий основные гистологические поражения, вызванные НАСГ, определяли в соответствии с классификацией Сети центров клинических исследований НАСГ (Kleiner 2005, Brunt 1999). Вкратце, оценивали стеатоз, лобулярное воспаление и баллонирование гепатоцитов. Для каждого индивидуума

выполняли оценку активности НАЖБП (оценку NAS) в виде невзвешенной суммы баллов стеатоза (0-3), лобулярного воспаления (0-3) и баллонирования (0-2).

Измерение уровней ферментов печени и СК18 в плазме.

Концентрации аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) измеряли в плазме с помощью набора Randox для Daytona Automate (Randox, кат. № AL 3801 и AS 3804, соответственно). Цитоцератин 18-M30 в плазме, суррогатный маркер апоптоза, измеряли с помощью ИФА набора 18-M30 для мышинового цитоцератина (CUSABIO, кат. № CSB-E14265m) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ экспрессии генов печени.

Общую РНК выделяли из печени мыши с помощью набора RNeasy Mini (Qiagen), следуя инструкциям производителя. Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью М-MLV RT (обратная транскриптаза из вируса мышинового лейкоза Молони) (Invitrogen, кат. № 28025) в 1х RT-буфере (Invitrogen), 0,5 мМ DTT (Invitrogen), 0,18 мМ dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Amersham) и 30 Ед. ингибитора РНКазы (Promega).

Затем выполняли количественную ПЦР с помощью системы детектирования методом ПЦР в реальном времени CFX96 Touch™ (Biorad). Вкратце, реакции ПЦР проводили в формате 96-WP в общем объеме 25 мкл, содержащем 1 мкл реакции обратной транскрипции, 0,5 мкл обратных и прямых праймеров (по 10 пмоль каждого) и 12,5 мкл 2X iQ SYBR Green Supermix (BioRad), используя следующие последовательности праймеров:

Ген	Прямой	Обратный
GAPDH	TATGACTCCACTCAGGCAA (SEQ ID NO:1)	TCCACGACATACTCAGCACC (SEQ ID NO:2)
α -SMA (ACTA2)	CTGACAGAGGCACCACTGAA (SEQ ID NO:3)	CATCTCCAGAGTCCAGCACA (SEQ ID NO:4)
Coll α 1	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO:5)	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO:6)
Coll α 2	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG (SEQ ID NO:7)	TTTGCCCCCAGGTATGCCAG (SEQ ID NO:8)
TGF β 1	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA (SEQ ID NO:9)	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC (SEQ ID NO:10)
TIMP1	ATTCAAGGCTGTGGGAAATG (SEQ ID NO:11)	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC (SEQ ID NO:12)
MMP2	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC (SEQ ID NO:13)	GCTTCCAACTTCACGCTCT (SEQ ID NO:14)
TNF α	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG (SEQ ID NO:15)	AGACAGAAGAGCGTGGTGGC (SEQ ID NO:16)
MCP1	GCCTGCTGTTCACAGTTGCC (SEQ ID NO:17)	CCTTGGGACACCTGCTGCTG (SEQ ID NO:18)

Уровни экспрессии нормализовали, используя в образцах экспрессию конститутивного гена GAPDH в качестве образца сравнения. Для каждого гена строили стандартные кривые путем выбора наилучших точек (по меньшей мере трех точек) таким образом, чтобы эффективность реакции ПЦР была близка к 100%, а коэффициент корреляции был близок к 1. Уровни экспрессии определяли с помощью уравнения стандартной кривой как для конститутивного гена, так и целевого гена (с учетом специфической эффективности ПЦР для каждого целевого гена).

Результаты и выводы.

Оценка элафибранора, CVC и их комбинации на in vitro модели фиброгенеза печени.

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов характерна для многих фиброзных заболеваний.

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

Агонист PPAR, элафибранор, демонстрирует антифибротическую активность в hHSC, активированных профиброгенным цитокином TGF β 1. Маркер α -SMA был снижен на 80% с IC₅₀=3,17 мкМ (фиг. 1A). Однако другие агонисты PPAR, такие как безафибрат, показали профиль слабой антифиброзной активности (фиг. 1C), что позволяет предположить, что агонисты PPAR не являются эквивалентными в отношении своих антифибротических свойств. Только CVC ни в одной из используемых доз не показал значимого эффекта в TGF β -активированных HSC (фиг. 1B). Для оценки возможного синергетического действия комбинации элафибранора с CVC в отношении уменьшения фиброза проводили эксперименты с помощью комбинационной матрицы в hGSC, индуцированных TGF β . Вкратце, выполняли серийное разведение растворов CVC и элафибранора в формате шахматной доски, получая матрицу из 42 комбинаций, охватывающую большую панель отношений элафибранора/CVC. Синергию сначала определяли путем вычисления баллов избытка по Блисссу. Эти эксперименты показали способность комбинации элафибранора с CVC снижать уровень продуцирование α -SMA в активированных hHSC (фиг. 2A и 2B). Один из лучших примеров синергизма показан на фиг. 2C с 5 мкМ каждого соединения. Хотя 5 мкМ только CVC не демонстрируют никакой антифиброзной активности, добавление этого препарата к 5 мкМ элафибранора может значительно синергетически увеличить активность элафибранора до 60% ингиби-

рования (по сравнению с 40% в случае применения 5 мкМ только элафибранора). В отличие от этого, комбинация CVC с безафибраном имела гораздо более низкие баллы EOV (фиг. 3А и 3В), и ни одна из комбинаций не дала статистически значимых результатов (фиг. 3С).

В заключение, неожиданно была обнаружена антифибротическая активность комбинации соединения формулы (I) со специфическим агонистом(ами) PPAR. Эти результаты предполагают, что комбинация соединения формулы (I) с агонистом PPAR может быть синергетической и может обеспечивать терапевтические преимущества при различных фиброзных заболеваниях.

Оценка элафибранора, CVC и их комбинации на модели продолжительной CDFF диеты (8 недель).

Западный образ жизни неизменно связан с высокими коэффициентами частоты неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), хронического заболевания печени, которое часто прогрессирует до фиброза и цирроза печени и в конечном итоге может привести к гепатоцеллюлярной карциноме. В настоящее время отсутствует установленный способ лечения НАСГ. Комбинации лекарственных веществ, направленные одновременно на несколько терапевтических мишеней, позволяют получить существенно улучшенную реакцию а воздействие этих лекарственных веществ и положительный терапевтический эффект в самой широкой популяции пациентов. Ранее комбинации лекарственных средств испытывали при других системных заболеваниях, таких как гипертония, дислипидемия или диабет 2 типа, и они показали улучшенный контроль основных заболеваний и позволили снизить заболеваемость и смертность. В недавних исследованиях фазы 2В как элафибранора (PPAR α / δ -агониста), так и CVC продемонстрировали свою эффективность при НАСГ-индуцированном фиброзе. Авторы изобретения хотели сравнить их действие на соответствующие показатели патологии НАСГ и выявить терапевтические преимущества, обеспечиваемые комбинации.

Для достижения этой цели НАСГ индуцировали у мышей C57B1/6J, которым давали корм, дефицитный по холину и L-аминокислотам, но с добавлением 2% холестерина и 30% молочного жира и кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы в питьевой воде (диета CDFF). Животные в группах лечения получали либо элафибранор (3 мг/кг/сутки), либо CVC (10 мг/кг/сутки), либо оба соединения в течение всего периода исследования. Развитие НАСГ оценивали с помощью гистологического анализа, функциональных тестов печени, а также биохимического и молекулярного анализа.

У мышей, получавших CDFF, развился НАСГ с тяжелыми осложнениями. У всех животных наблюдали прогрессирующий стеатоз и лобулярное воспаление, что и обеспечило высокий балл по шкале NAS, равный 6 или 7 (фиг. 4А). Хотя в этой модели баллонирование не было явным, о гепатоцеллюлярных повреждениях свидетельствовали высокие уровни AST и CK18 в плазме (рис. 4В-С). Экспрессия генов, связанных с фиброгенезом, ремоделированием тканей и воспалением, была увеличена и соответствовала сигнатурным генам, которые согласно более ранним сообщениям характерны для пациентов с тяжелой степенью НАСГ (фиг. 5).

Элафибранор привел к улучшению показателей, согласно результатам гистологического анализа НАСГ, за счет уменьшения степени стеатоза и лобулярного воспаления печени, что привело к общему снижению показателя NAS (фиг. 4А). Элафибранор также уменьшил степень повреждения печени, о чем свидетельствовало снижение концентрации AST и CK18 в плазме (фиг. 4В-С). Кроме того, элафибранор позволил снизить уровень экспрессии генов, связанных с воспалением, ремоделированием тканей и фиброгенезом (фиг. 5). Хотя ведение только CVC не оказало влияния на эти параметры, комбинированное лечение элафибранора+CVC оказало синергетическое положительное действие на активность заболевания (NAS) и гепатоцеллюлярные повреждения (уменьшение уровней AST и CK18 в плазме) (фиг. 4), а также на экспрессию генов, связанных с воспалением, ремоделированием тканей и фиброгенезом (фиг. 5).

В заключение, в настоящей заявке продемонстрирован синергетический эффект элафибранора в комбинации с CVC на параметры НАСГ и фиброгенез в мышинной модели CDFF. Из этого исследования можно заключить, что комбинация элафибранора/CVC будет полезной для более широкой популяции пациентов.

Ссылки

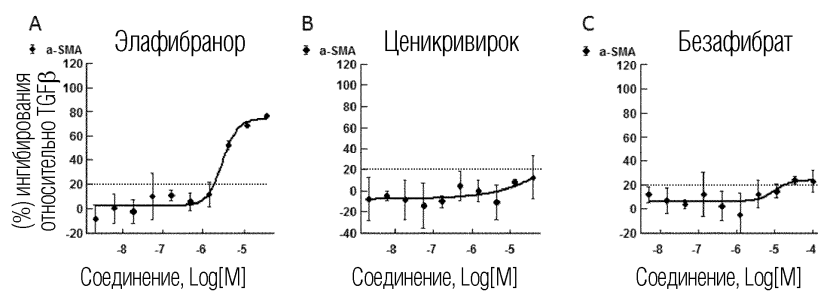
- Brunt EM et al., 1999, Am. J Gastroenterol; 94 (9):2467-74.
- Dowman J.K. et al., 2010, Q J Med; 103:71-83
- Kleiner DE et al., 2005, Hepatology; 41 (6):1313-21
- Marchesini G et al. 2003. гемодиализ; 37:917-923.
- Mells JE et al., 2015. J Nutr Biochem; 26:285-292
- Nelson A et al., 2009. J Clin Gastroenterol; 43:990-994
- Neuschwander-Tetri et al., 2003. Гепатология; 38:1008-1017.
- Yeh M et al., 2007. Am J Clin Pathol; 128:837-847.
- Шири-Свердлов Р. и др., 2006. J Hepatol; 44:732-41.
- Vuppalanchi R and Chalasani N, 2009. Гепатология; 49:306-

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

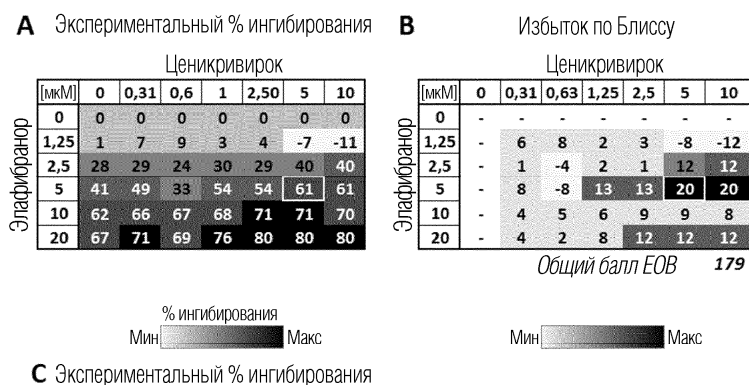
1. Применение фармацевтической комбинации, содержащей:
 - (i) ценикривирок (CVC) или его фармацевтически приемлемую соль и
 - (ii) элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль в способе лечения фиброзного заболевания.
2. Применение по п.1, где фармацевтическая комбинация представляет собой композицию, содержащую компоненты (i) и (ii) и фармацевтически приемлемый носитель.
3. Применение по п.1, где фармацевтическая комбинация представляет собой набор компонентов, включающий компоненты (i) и (ii) для последовательного, раздельного или одновременного применения.
4. Применение по любому из пп.1-3, в котором компоненты (i) и (ii) приготовлены в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или средства в виде галеновых форм для пролонгированного и/или замедленного высвобождения.
5. Применение по любому из пп.1-4, где фармацевтическая комбинация дополнительно содержит по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, выбранный из пирфенидона или ингибиторов активности рецепторных тирозинкиназ (RTKI), таких как нинтеданиб, сорафениб и других RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитора CTGF, или любого антифибротического соединения, восприимчивого к нарушению сигнальных путей, активируемых TGF β и BMP, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β I типа (TGFBR1) или II типа (TGFBR2) и их лиганды, такие как TGF β , активин, ингибин, Nodal, анти-мюллеровый гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты канонического SMAD-зависимого пути, включая регуляторные или ингибиторные SMAD-белки или члены SMAD-независимых или неканонических путей, в том числе различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, сигнальные пути Rho-подобных ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, процесса TGF β -индуцированного EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены путей WNT или Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .
6. Применение по любому из пп.1-5, где фармацевтическая комбинация дополнительно содержит по меньшей мере один терапевтически активный агент, выбранный из JAK/STAT ингибиторов и других противовоспалительных агентов и/или иммунодепрессантов.
7. Применение по п.6, в котором терапевтически активный агент выбирают из глюкокортикоидов, НПВП, циклофосфамида, нитрозоомечевин, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пурина, аналогов пиримидина, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов сфингозин-1-фосфатного рецептора, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и рецепторы провоспалительных цитокинов, Т-клеточный рецептор и интегрины.
8. Применение по любому из пп.1-7, где фиброзное заболевание выбирают из группы, состоящей из фиброза печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичка, яичников, надпочечников, артерий, вен, толстой кишки, кишечника (например, тонкой кишки), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка.
9. Применение по любому из пп.1-8, где фиброзное заболевание выбирают из группы, состоящей из фиброза печени, желудочно-кишечного тракта, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей, костного мозга, кишечника и суставов.
10. Применение по любому из пп.1-9, где заболевание выбирают из группы, состоящей из фиброза или цирроза печени любого происхождения, фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированного фиброза или цирроза, НАСГ-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, медикаментозного фиброза или цирроза печени, инфекционного фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, бактериального фиброза или цирроза печени, вирусного фиброза или цирроза, фиброза или цирроза печени, вызванного HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного как смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза, индуцированного лучевой или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени, вызванного любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброза кишечника любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, фиброза тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза кожи, фиброза эпидермиса, фиброза эндодермы, фиброза кожи вследствие склеродермии/системного склероза, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эм-

физема, легкое курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF); фиброза сердца, фиброза почек, нефрогенного системного фиброза, фиброза мышц, фиброза мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброза костного мозга, фиброза суставов, фиброза сухожилий, фиброза хряща, фиброза поджелудочной железы, фиброза матки, фиброза нервной системы, фиброза яичка, фиброза яичников, фиброза надпочечников, фиброза артерий, фиброза вен, фиброза глаз, эндомикардиального фиброза, фиброза средостения, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, прогрессирующего массивного фиброза (осложнения пневмокониоза шахтеров), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, перимплантационного фиброза и асбестоза, артрофиброза, спаечного капсулита.

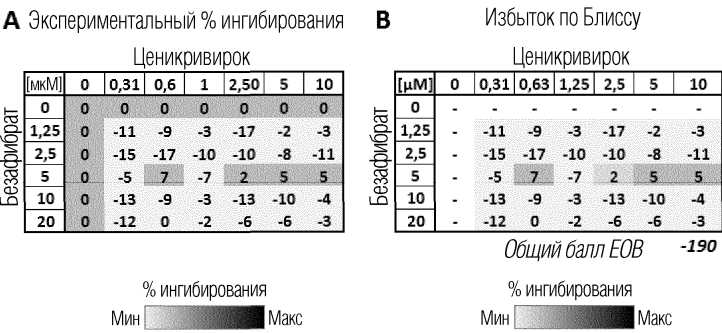
11. Применение по любому из пп.1-10, где заболевание выбирают из группы, состоящей из фиброза или цирроза печени, вызванного метаболическими заболеваниями, НАЖБП-индуцированного фиброза или цирроза, НАСГ-индуцированного фиброза или цирроза, алкоголь-индуцированного фиброза или цирроза печени, медикаментозного фиброза или цирроза печени, инфекционного фиброза или цирроза печени, фиброза или цирроза печени, вызванного паразитарной инфекцией, бактериального фиброза или цирроза печени, вирусного фиброза или цирроза, фиброза или цирроза печени, вызванного HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванного смешанной HCV/ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза, индуцированного лучевой или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени, вызванного любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброза желудочно-кишечного тракта любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, фиброза тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз (IPF).



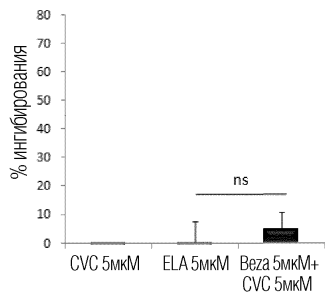
Фиг. 1



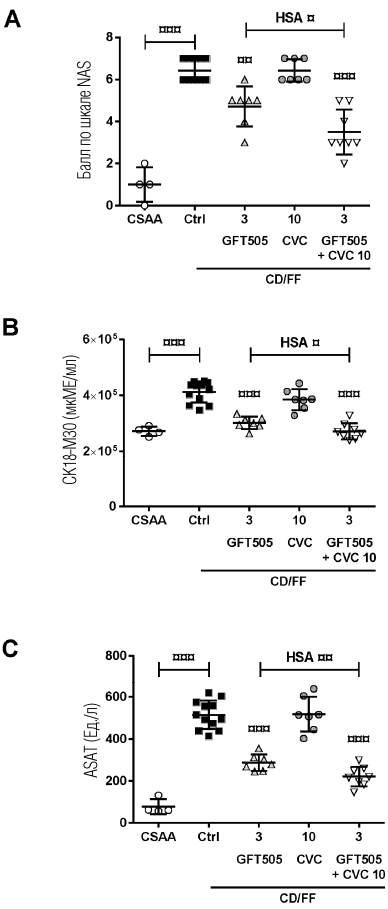
Фиг. 2



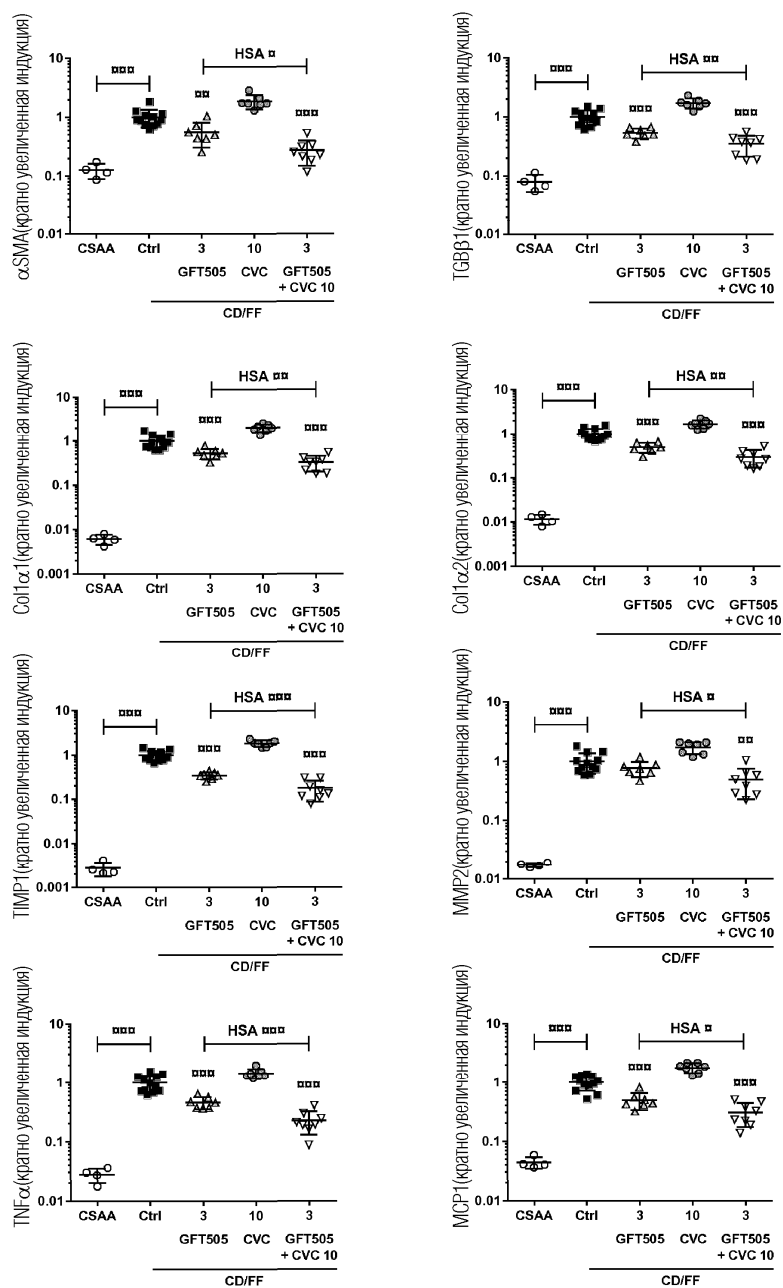
С Экспериментальный % ингибирования



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2