

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042720**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.20

(21) Номер заявки
201991733

(22) Дата подачи заявки
2018.01.29

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

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

(31) 17305094.9; 17305268.9; 17190723.1

(32) 2017.01.27; 2017.03.13; 2017.09.12

(33) EP

(43) 2019.12.30

(86) PCT/EP2018/052159

(87) WO 2018/138352 2018.08.02

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

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

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

(56) XU TAN ET AL.: "Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 11, 14 October 2012 (2012-10-14), pages 1125-1130, XP055065730, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2391, page 1127 - page 1128

CHOLONGITAS E. ET AL.: "Review article: Novel therapeutic options for chronic hepatitis C", ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS LTD., CAMBRIDGE, GB, vol. 27, no. 10 1 May 2008 (2008-05-01), pages 866-884, XP002681940, ISSN: 0269-2813, DOI: 10.1111/J.1365-2036.2008.03644.X, Retrieved from the Internet: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2008.03644.x/pdf> [retrieved on 2008-02-12], page 870; table 1

RATZIU ET AL.: "ELAFIBRANOR AN AGONIST OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR ALPHA AND DELTA, INDUCES RESOLUTION OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS WITHOUT FIBROSIS WORSENING", GASTROENTEROLOGY, vol. 150, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 1147-1159.5, XP002771602, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2016.01.038, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085%2816%2900140-2/pdf>, the whole document

(57) Изобретение относится к фармацевтическому комбинированному продукту, содержащему: (i) соединение, выбранное из группы, состоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их фармацевтически приемлемой соли; и (ii) по меньшей мере один агонист PPAR, выбранный из группы, состоящей из элафибранора, селадельпара, сароглитазара, ланифибранора и их фармацевтических солей. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению вышеуказанной фармацевтической комбинации в качестве лекарственного средства для лечения фиброзного заболевания.

B1

042720

042720 B1

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому комбинированному продукту, содержащему нитазоксанид (NTZ) или его производное и агонист PPAR, для терапевтического применения.

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

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

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

Возьмем в качестве примера PPAR α , его действие опосредуется классом соединений, таких как фибраты, которые оказывают липидоснижающее действие. Также были идентифицированы природные лиганды, такие как, например, жирные кислоты, эйкозаноиды (лейкотриен B₄) и 8(S)-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (Kliwer SA с соавт., 1997). PPAR связывали главным образом с метаболизмом липидов и глюкозы. Активаторы PPAR, такие как фибраты, позволяют регулировать концентрации холестерина и триглицеридов в плазме посредством активации PPAR α (Hourton D с соавт., 2001). Фибратная терапия приводит к увеличению окисления жирных кислот в печени. Фибраты также снижают синтез триглицеридов (Staels B и Auwerx J, 1998). Активаторы PPAR α также способны корректировать гипергликемию и уровень инсулина. Фибраты также уменьшают массу жировой ткани посредством механизма, который не зависит от приема пищи и экспрессии гена лептина (Gueghe-Millo M с соавт., 2000). Терапевтическую пользу агонистов PPAR γ широко исследовали в лечении диабета 2 типа (Spielgelman BM, 1998). Было показано, что агонисты PPAR γ восстанавливают чувствительность к инсулину в тканях-мишенях и снижают уровни глюкозы, липидов и инсулина в плазме как на животных моделях диабета 2 типа, так и у людей (Ram VJ, 2003). Активация PPAR лигандами также играет роль в регуляции экспрессии генов, которые участвуют в таких процессах, как воспаление, ангиогенез, пролиферация и дифференцировка клеток, апоптоз и активность индуцибельной NO-синтетазы (iNOS), матриксной металлопротеиназы (MMPase) и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP). Активация PPAR α в кератиноцитах приводит к прекращению их пролиферации и экспрессии генов, участвующих в дифференцировке (Komuves LG с соавт., 2000). PPAR обладают противовоспалительными свойствами, поскольку они негативно влияют на механизмы транскрипции, вовлекающие другие факторы транскрипции, такие как NF- κ B, или активаторы транскрипции, такие как STAT и AP-1 (Desvergne B и Wahli W, 1999). Указанные противовоспалительные и антипролиферативные свойства делают PPAR (и особенно PPAR α)

интересными терапевтическими мишенями для лечения таких заболеваний, как окклюзионные сосудистые заболевания (атеросклероз и т.д.), гипертония, заболевания, связанные с неоваскуляризацией (диабетическая ретинопатия и т.д.), воспалительные заболевания (воспалительные заболевания кишечника, псориаз и т.д.) и неопластические заболевания (канцерогенез и т.д.)

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

Следовательно, настоящее изобретение относится фармацевтическому комбинированному продукту, содержащему:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их фармацевтически приемлемой соли; и

(ii) по меньшей мере один агонист PPAR, выбранный из группы, состоящей из Элафибранора, Селадельпара, Сароглитазара, Ланифибранора и их фармацевтически приемлемой соли.

В конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтический комбинированный продукт содержит:

(i) соединение, выбранное из нитазоксанида, тизоксанида и их фармацевтически приемлемой соли; и

(ii) Элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтический комбинированный продукт представляет собой композицию, содержащую компоненты i) и ii) и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтический комбинированный продукт представляет собой набор частей, содержащих компоненты i) и ii) для последовательного, раздельного или одновременного применения.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтический комбинированный продукт дополнительно содержит по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, выбранный из ингибиторов пирфенидона или рецепторной тирозинкиназы (RTKI), таких как Нинтеданиб, Сорафениб и другие RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибиторов CTGF, или любого антифибротического соединения, чувствительного к препятствованию TGF β и BMP-активированных путей, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1, или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBR1) или типа II (TGFBR2) и их лиганды, такие как TGF β , Активин, ингибин, Нодаль, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие SMAD-белки, или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, Rho-подобные сигнальные пути GTPase, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, TGF β -индуцированный процесс EMT, или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая Hh-лиганды или гены-мишени, или любые члены WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .

В другом конкретном варианте осуществления изобретения фармацевтический комбинированный продукт дополнительно содержит по меньшей мере один терапевтически активный агент, выбранный из ингибиторов JAK/STAT и других противовоспалительных и/или иммунодепрессантных агентов.

В предпочтительном варианте дополнительного терапевтически активный агент выбран из глюкокортикоидов, НПВП, циклофосфамида, нитрофосфамида, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пурина, аналогов пиримидина, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов сфингозин-1-фосфатных рецепторов, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и провоспалительные рецепторы цитокинов, T-клеточный рецептор и интегрин.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения компоненты (i) и (ii) в составе фармацевтического комбинированного продукта объединены в лекарственную форму в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или средства галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

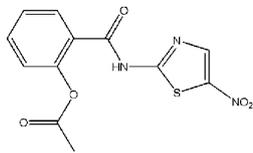
Настоящее изобретение также относится к применению охарактеризованного выше фармацевтического комбинированного продукта в качестве лекарственного средства.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению охарактеризованного выше фармацевтического комбинированного продукта в способе лечения фиброзного заболевания.

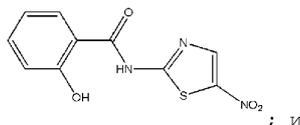
В частности, настоящее изобретение относится к применению охарактеризованного выше фармацевтического комбинированного продукта в способе лечения фиброзного заболевания, где фиброзное

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

В соответствии с настоящим изобретением компонент (i) комбинированного продукта выбран из: NTZ:



тизоксанида:



и их фармацевтически приемлемых солей.

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

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-дельта" в контексте настоящего документа включает MBX8025 (Селадельпар или {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2H-[1,2,3]триазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту).

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа/гамма" (также называемый глитазары) в контексте настоящего документа включает Сароглитазар.

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа/дельта" означает Элафибранор (GFT505).

В соответствии с изобретением термин "агонист PPAR-альфа/гамма/дельта", IVA337 (Ланифибранор).

Агонист PPAR может быть в форме фармацевтически приемлемой соли.

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

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

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

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

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

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

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

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

Фармацевтический комбинированный продукт по изобретению предназначен для одновременного, последовательного или раздельного введения в терапии, поэтому допустимо, чтобы он был включен в различные композиции. В случае последовательного введения NTZ и/или тизаксонид могут быть введены до агониста(ов) PPAR, или агонист(ы) PPAR вводят до NTZ и/или тизаксонид.

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

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

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

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

Эти композиции могут быть составлены в форме инъекционных суспензий, гелей, масел, мазей, пилуль, 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 этого типа состава могут быть преимущественно использованы такие агенты, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

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

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

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

Частота и/или доза, относящаяся к введению, может быть подобрана специалистом в данной области техники в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, комбинация (на-

пример, в форме фармацевтической композиции или составного набора) по настоящему изобретению может быть введена для лечения фиброзного заболевания в дозе для NTZ или аналога NTZ или агониста PPAR, такого как соединение формулы (I), или (II) или (III), составляющей от 0,01 до 4000 мг/день, например от 50 до 2000 мг/день и, в частности, от 100 до 1000 мг/день.

Доза агониста(ов) PPAR в указанной комбинации может варьироваться в зависимости от самого агониста PPAR. Доза подбирается к эффективности агониста PPAR.

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

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

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

Изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Описание фигур и таблиц

Фиг. 1: Антифибротический эффект Элафибранора и Нитазоксанида в TGFβ-индуцированных hHSC

Бессывороточные HSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с Элафибранором (A) или Нитазоксанидом (B) или Безафибратом (C) перед активацией с помощью профиброгенного цитокина TGFβ1 (1 нг/мл). После 48 ч инкубации экспрессию α-GMA измеряли с помощью ELISA. Полученные значения трансформировали в проценты ингибирования по сравнению с контролем TGFβ1. Данные представлены как среднее (из трех повторений) ± стандартное отклонение (SD). Обработку кривых и расчет половины максимальной ингибирующей концентрации (IC50) проводили с помощью программного обеспечения XLFit 5.3.1.3.

Фиг. 2: Комбинация Элафибранора с Нитазоксанидом синергически ингибирует α-GMA в TGFβ1-индуцированных hHSC

Комбинации тестировали в матричной форме "доза-эффект" и анализировали в соответствии с моделью приращения над аддитивизмом по Блисссу (ЕОВ). Готовили серии разведений Элафибранора (ряд) и Нитазоксанида (столбец), включая их соответствующие контроли ДМСО. Полученные смеси добавляли к бессывороточным HSC за 1 ч до активации с помощью профиброгенного цитокина TGFβ1 (1 нг/мл). (A) Проценты ингибирования α-GMA по сравнению с контролем TGFβ1 для всех пар комбинаций. Данные представлены в виде среднего из четырех повторений. (B) Показатели ЕОВ рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений с положительным значением ЕОВ считалась синергической (от светло-серого до черного). Общий показатель ЕОВ, включающий все комбинации, также рассчитывали. (C) Значения данных, полученные от пары синергической комбинации, наносили на график, представленный в виде гистограммы. Данные представлены как среднее (из четырех повторений) ± стандартное отклонение (SD). Модель ЕОНСА использовали, как описано в разделе "Материалы и методы", для подтверждения синергизма выбранных пар комбинаций NTZ/ELA.

Фиг. 3: Комбинация агонистов PPAR с Нитазоксанидом синергически ингибирует α-GMA в TGFβ1-индуцированные hHSC

Комбинации тестировали в матричной форме "доза-эффект" и анализировали в соответствии с моделью приращения над аддитивизмом по Блисссу (ЕОВ). Готовили серии разведений Сароглитазара, Селадельпара и Ланифибранора, и Нитазоксанида, включая их соответствующие контроли ДМСО. Полученные смеси добавляли к бессывороточным HSC за 1 ч до активации с помощью профиброгенного цитокина TGFβ1 (1 нг/мл). Рассчитывали проценты ингибирования α-GMA по сравнению с контролем TGFβ1 для всех пар комбинаций. Показатели ЕОВ рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений с положительным значением ЕОВ считалась синергической (от светло-серого до черного).

(A) Сароглитазар (SARO)

(B) Селадельпар (SELA)

(C) Ланифибранор (LANI)

Проценты ингибирования α-GMA по сравнению с контролем TGFβ1, полученные из пары синергических комбинаций, наносили на график, представленный в виде гистограммы. Данные представлены как среднее (из четырех повторений) ± стандартное отклонение (SD). Модель ЕОНСА использовали, как описано в разделе "Материалы и методы", для подтверждения синергизма выбранных пар комбинаций.

Фиг. 4: Содержание печеночного коллагена

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

Для каждого графика указывали точное количество доз воздействия.

После умерщвления определяли содержание печеночного коллагена.

Фиг. 5: Процент фиброза печени

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

Для каждого графика указывали точное количество доз воздействия.

После умерщвления определяли площадь фиброза печени.

Фиг. 6: Экспрессия гена α GMA в печени

Фиг. 7: Экспрессия гена CCR2 в печени

Фиг. 8: Экспрессия гена CCR5 в печени

Фиг. 9: Экспрессия гена Col1a2 в печени

Фиг. 10: Экспрессия гена MMP2 в печени

Фиг. 11: Экспрессия гена TIMP2 в печени

Фиг. 12: Экспрессия гена TGF β 1 в печени

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

AP-1	Активирующий белок-1
ASBTi	Ингибитор апикального натрий-созависимого переносчика желчных кислот
ASK1	Сигнал-регулирующая киназа 1
AT1	Ангиотензин 1
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких
CTGF	Фактор роста соединительной ткани
DGAT	Диацилглицерин-О-ацилтрансфераза
DMCO	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DPP4	Дипептидилпептидаза
ELISA	Иммуноферментный анализ
ЕОВ	Приращение по Блисссу
FABAC	Конъюгат жирных кислот с желчными кислотами
FBS	Фетальная бычья сыворотка
FGF	Фактор роста фибробластов
FXR	Фарнезоеидный X-рецептор
GDF	Фактор роста и дифференцировки
GLP-1	Глюкагоноподобный пептид-1
GPCR	Рецептор, сопряженный с G-белком
HBV	Вирус гепатита В
HCV	Вирус гепатита С
15-НЕРЕ	5-гидроксиэйкозопентаеновая кислота
HIV	Вирус иммунодефицита человека
HSC	Звездчатая клетка печени
IC50	Половина максимальной ингибирующей концентрации
iNOS	Индукцибельная синтаза оксида азота

IPF	Идиопатический легочный фиброз
LANI	Ланифибранор
LBD	Лиганд-связывающий домен
LPS	Липополисахарид
LT	Лейкотриен
MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа
MMP-9	Металлопротеаза-9
MMPase	Металлопротеаза
NADPH	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NAFLD	Неалкогольная жировая дистрофия печени
NASH	Неалкогольный стеатогепатит
NF-κB	Ядерный фактор каппа-В
NOX	NADPH-оксидаза
NSAIDs	нестероидные противовоспалительные средства
NTZ	Нитазоксанид
PAR	Протеазо-активируемый рецептор
PBC	Первичный билиарный холангит
PDE	Фосфодиэстераза
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста
PFIC3	Наследственный внутрипеченочный холестаза типа 3
PFOR	Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза
PPAR	рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
PPRE	Элементы ответа PPAR
PSC	Первичный склерозирующий холангит
ROCK	Rho-ассоциированная протеинкиназа
RTK	Рецепторная тирозинкиназа
SARO	Сароглитазар
SD	Стандартное отклонение
SELA	Селадельпар
SGLT	Натрий-глюкозный транспортер
STAT	Передатчики сигнала и активаторы транскрипции
TGFβ	Трансформирующий фактор роста-β
TGFβRI	рецепторы TGFβ типа I
TGFβRII	рецепторы TGFβ типа II
THBS1	Тромбоспондин-1
THR β	β-рецептор щитовидной железы
TIMP	Тканевый ингибитор металлопротеазы
TLR-4	Toll-подобный рецептор 4
TZ	Тизоксанид
TZG	Тизоксанида глюкуронид
VAP-1	Сосудистый адгезивный белок-1

Примеры

Материалы и методы

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

Культивирование hHSC

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

Получение композиций

2-х компонентная комбинационная матрица (NTZ/Элафибранор)

Для этих экспериментов составляли матрицу методом "шахматной доски". Исходные растворы

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

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

Активация hHSC с помощью TGF-β1 и лечение соединением

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Inpprot) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем клетки высевали с плотностью 2×10⁴ клеток/лунка в 96-луночные планшеты и 6500 клеток/лунка в 384-луночные планшеты для измерения α-ГМА с помощью ELISA. На следующий день клеточную культуральную среду удаляли и клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (Invitrogen кат. № 14190). hHSC депривировали в течение 24 ч в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде.

Для обработок с помощью NTZ, Элафибранора или других агонистов PPAR и соответствующих комбинаций NTZ/Элафибранора или агонистов PPAR, бессывороточные hHSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с соединениями с последующим добавлением профиброгенных стимулов TGF-β1 (PeproTech кат. № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS в течение дополнительных 48 ч.

Иммуноферментный анализ (ELISA) α-ГМА

Уровень α-ГМА измеряли с помощью сэндвич-варианта ELISA. Вкратце, лунки планшета ELISA сначала покрывали иммобилизованным антителом (мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в ФСБ+0,2% Твин 20 в течение одного часа добавляли блокирующий раствор, состоящий из ФСБ+0,2% БСА, после чего следовал еще один цикл промывки. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом в течение 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки добавляли идентифицирующее антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим 3 промывками. Для обнаружения сначала применяли HRP-конъюгированный Стрептавидин (R&D Systems кат. № DY998) в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки добавляли субстрат ТМВ для HRP (BD, № 555214) и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. При окислении ТМВ образует водорастворимый синий продукт реакции, который становится желтым с добавлением серной кислоты (стоп-раствор), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм с использованием спектрофотометра. Проявленный цвет прямо пропорционален количеству α-ГМА, присутствующему в лизате.

Определение синергизма методом приращения по Блиссу (ЕОВ) и подтверждение с помощью EONSA (приращение над максимумом отдельно взятого агента)

Значения, полученные в анализах ELISA αГМА, сначала трансформировали в проценты ингибирования по сравнению с контролем TGF-β1. Затем, используя эти проценты ингибирования, определяли ЕОВ (приращение по Блиссу) для установления синергетического эффекта комбинаций лекарственных средств. Ожидаемый показатель аддитивизма по Блиссу (Е) сначала определяли по формуле:

$$E=(A+B)-(A \times B),$$

где А и В - процент ингибирования NTZ (А) и Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара или Ланифибранора (В) в данной дозе. Разница между ожиданием по Блиссу и наблюдаемым ингибированием комбинированных NTZ/Элафибранора, Сароглитазара, Селадельпара или Ланифибранора в одной и той же дозе представляет собой показатель "приращение по Блиссу".

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

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

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

Для комбинации NTZ+Элафибранор рассчитывали дополнительный общий показатель по Блиссу суммированием всех ЕОВ.

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

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

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

План эксперимента

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

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

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

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

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

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

Самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 6 недель кормили в течение 12 недель в соответствии с планом эксперимента, подробно приведенным в табл. 1.

Таблица 1. План эксперимента

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

Контролем служила диета CSAA.

Некоторые мыши получали диету CDAAs.

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

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

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

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

Группу, соответствующую диете CDAAs, дополненной NTZ в дозе 100 мг/кг, также называют мышами C57Bl/6J, получавшими диету CDAA+0,0667% (мас./мас.) нитазоксанида, что соответствует теоретической дозе 100 мг/кг/день.

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

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

Стандартный образец и номер партии нитазоксанида приведены в табл. 2.

Таблица 2. Стандартные образцы нитазоксанида

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

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

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

Потребление пищи выражается в граммах пищи/грамм животного/день:

0,02% нитазоксанида в рационе

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

Фактическая доза соединения:

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

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

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

Таким же образом:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Биохимия плазмы

Аланинаминотрансфераза (ALT)

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

Аспаргатаминотрансфераза (AST)

Концентрацию AST в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автомата Daytona (Randox, кат. № AS 3804). Вкратце, AST в образце плазмы ферментативно превращает α -оксoglутарат и L-аспарат в L-глутамат и оксалоацетат. В присутствии NADH образующийся оксало-

ацетат превращается малатдегидрогеназой с образованием L-малата и NAD^+ . Кинетика реакции изучена и позволяет рассчитать уровни AST в плазме. Результаты выражены в U/л.

Гистология

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

Заливка тканей и изготовление срезов

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

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

Красное окрашивание пикросириусом

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

Гистологические исследования

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

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

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

Таблица 5. Критерии CRN для фиброза

Параметр	Баллы по шкале	Описание (рассматривали весь срез)	
		Фиброз	0
1	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз или портальный/перипортальный фиброз		
2	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и портальный/перипортальный фиброз		
	3	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и/или портальный фиброз с фокальным или распространенным мостовидным фиброзом	
		Цирроз	
	4	Цирроз	

Статистический анализ

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

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

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

Измерение содержания печеночного коллагена

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

Полный гидролиз образцов ткани в 6 М HCl при 95°C требуется перед введением дозы гидроксипролина. В результате анализа образуется хромоген с максимумом поглощения при 570 нм. Результаты выражены в мг коллагена/г печени.

N-концевой пропептид проколлагена III (P1INP)

Концентрацию P1INP в плазме определяли с использованием анализа ELISA от Cloud-Clone Corp (кат. № SEA573Ra) в соответствии с инструкциями производителя. Планшет для микротитрования предварительно покрывают антителом, специфичным к P1INP. Стандарты или образцы добавляют в соответствующие лунки планшета для микротитрования с биотин-конъюгированным антителом, специфичным к P1INP. Затем в каждую лунку микропланшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. После добавления раствора субстрата ТМВ только те лунки, которые содержат P1INP, биотин-конъюгированное антитело и фермент-конъюгированный авидин, будут иметь изменение цвета. Реакцию фермент-субстрат завершают добавлением раствора серной кислоты, и изменение цвета измеряют спектрофотометрически на длине волны 450 нм±10 нм. Концентрацию P1INP в образцах затем определяют путем сравнения оптической плотности (OD) образцов со стандартной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Экспрессия генов

Извлечение РНК

Общую РНК печени выделяли с использованием набора Nucleospin® 96 (Macherey Nagel) в соответствии с инструкциями производителя. 150 нг общей РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV-RT (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони) (Invitrogen кат. № 28025) в присутствии 1× буфера обратной транскриптазы (RT) (Invitrogen кат. № P/NY02321), 1 мМ ДТТ (Invitrogen кат. № P/NY00147), 0,5 мМ дНТФ (Promega), 200 нг pdN6 (Roche кат. № 11034731001) и 40U ингибитора рибонуклеазы (Promega кат. № N2515).

Затем проводили количественную ПЦР с использованием системы обнаружения ПЦР в режиме реального времени CFX96 Touch™ (BioRad). Вкратце, реакции ПЦР проводили в 96-луночных планшетах на 5 мкл 5×разбавленной смеси для обратной транскрипции с использованием набора iQ SYBR Green Supermix (BioRad кат. № 170887). Условия эксперимента представляли собой: 20 мкл объемной реакции и 0,5 мкл каждого из обратных и прямых праймеров (10 пМоль).

Название праймера	Идентификатор (ID) последовательности	Последовательность (5'→3')
α ГМА прямой	1	CTGACAGAGGCCACTGAA
α ГМА обратный	2	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col1 α 1 прямой	3	AGGCCAACAAGGTGACAGAG
Col1 α 1 обратный	4	GCCAGGAGAACCAGCAGAG
Col1 α 2 прямой	5	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG
Col1 α 2 обратный	6	TTTGCCCCAGGTATGCCAG
TGF β 1 прямой	7	TTGCTTCAGTCCACAGAGA
TGF β 1 обратный	8	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TIMP1 прямой	9	ATTC AAGGCTGTGGGAAATG
TIMP1 обратный	10	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TIMP2 прямой	11	GCATCACCCAGAGAAGAGC
TIMP2 обратный	12	GGGTCTCGATGTCAAGAAA
MP2 прямой	13	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC
MP2 обратный	14	GCTTCCAACTTCACGCTCT
MP7 прямой	15	TAATGGCTTCGCAAGGAGA
MP7 обратный	16	AAGGCATGACCTAGAGTGTTC
CCR2 прямой	17	TAATATGTTACCTCAGTTCATCCACGG
CCR2 обратный	18	TGCTCTCAGCTTTTACAGCSTATC
CCR5 прямой	19	ATTCTCCACCCCTGTTTCG
CCR5 обратный	20	GAATTCCTGGAAGGTGGTCA
GAPDH прямой	21	TATGACTCCACTCACGGCAA
GAPDH обратный	22	TCCACGACATACTCAGCACC

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

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

Результаты и выводы:

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов характерна для многих фиброзных заболеваний.

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

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

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

Для подтверждения синергизма экспериментальные значения, соответствующие верхнему показателю EOB, наносили на гистограмму (фиг. 2C). Эти графики показывают, что комбинация NTZ с Элафибранором демонстрирует превосходящий антифиброзный эффект, который является статистически значимым по сравнению с наибольшим эффектом отдельно взятого агента (NTZ или Элафибранора). Наиболее впечатляющий пример представлен комбинационной парой NTZ в концентрации 0,6 мкМ и Элафибранора в концентрации 5 мкМ. Хотя NTZ практически не проявляет антифибротическую активность при 0,6 мкМ, добавление Элафибранора при 5 мкМ приводит к сильному снижению α ГМА на 55%,

что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый только для отдельно взятых агентов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

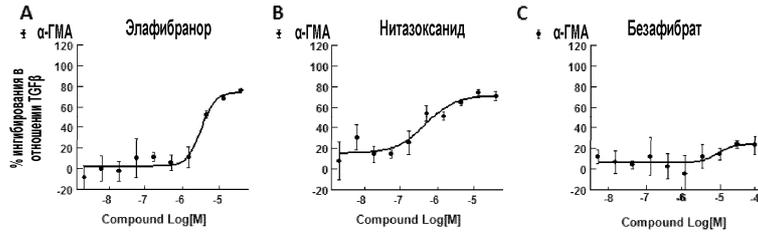
Когда вводят комбинацию Элафибранора и NTZ, снижение экспрессии генов больше, чем снижение, наблюдаемое для каждого соединения, взятого отдельно.

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

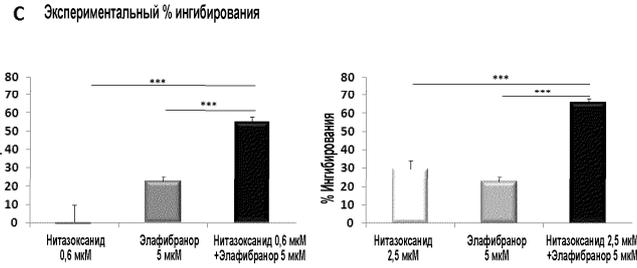
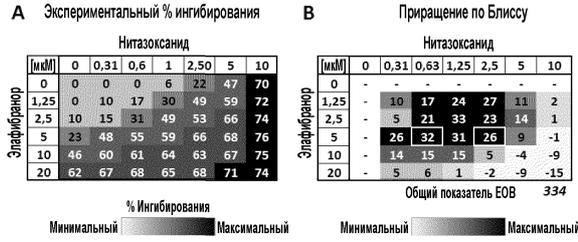
В заключение, заявитель обнаружил неожиданную синергическую антифибротическую активность для комбинации соединения формулы (I) со специфическим агонистом(ами) PPAR. Эти результаты предполагают, что комбинация соединения формулы (I) с агонистом PPAR может быть синергетической и/или может иметь дополнительные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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

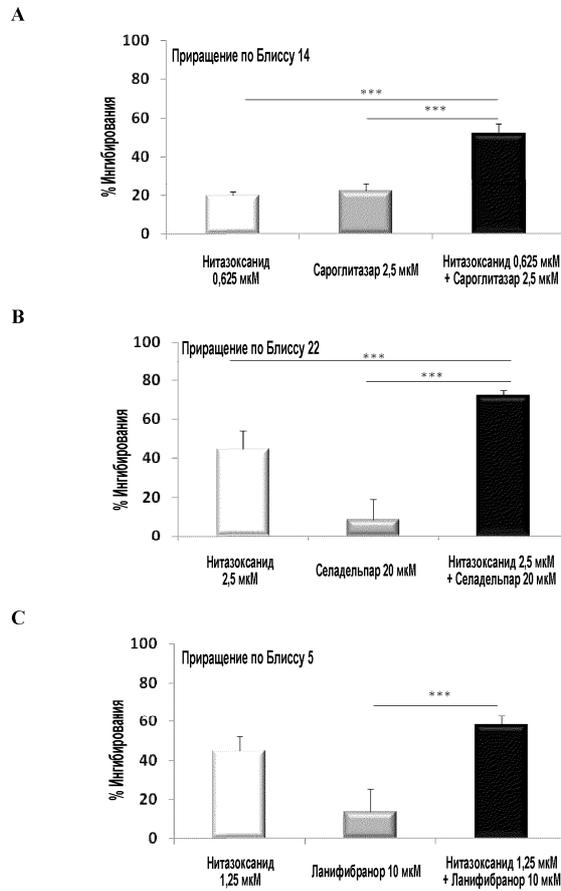
1. Фармацевтический комбинированный продукт, содержащий:
 - (i) соединение, выбранное из группы, состоящей из нитазоксанида, тизоксанида и их фармацевтически приемлемой соли; и
 - (ii) по меньшей мере один агонист PPAR, выбранный из группы, состоящей из элафибранора, селадельпара, сароглитазара, ланифибранора и их фармацевтически приемлемой соли.
2. Фармацевтический комбинированный продукт по п.1, содержащий:
 - (i) соединение, выбранное из нитазоксанида, тизоксанида и их фармацевтически приемлемой соли;и
 - (ii) Элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.
3. Фармацевтический комбинированный продукт по п.1 или 2, где комбинированный продукт представляет собой композицию, содержащую компоненты i) и ii) и фармацевтически приемлемый носитель.
4. Фармацевтический комбинированный продукт по п.1 или 2, где комбинированный продукт представляет собой набор частей, содержащих компоненты i) и ii) для последовательного, отдельного или одновременного применения.
5. Фармацевтический комбинированный продукт по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, выбранный из ингибиторов пирфенидона или рецепторной тирозинкиназы (RTKI), таких как Нинтеда-ниб, Сорафениб и другие RTKI, или блокаторов рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибиторов CTGF, или любого антифибротического соединения, чувствительного к препятствованию TGF β и BMP-активированных путей, включая активаторы латентного комплекса TGF β , такие как MMP2, MMP9, THBS1, или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGF β типа I (TGFBR1) или типа II (TGFBR2) и их лиганды, такие как TGF β , Активин, ингибин, Нодаль, антимюллеров гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие SMAD-белки, или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, Rho-подобные сигнальные пути GTPase, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/АКТ, TGF β -индуцированный процесс ЕМТ, или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая Hh-лиганды или гены-мишени, или любые члены WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .
6. Фармацевтический комбинированный продукт по любому из пп.1-5, дополнительно содержащий по меньшей мере один терапевтически активный агент, выбранный из ингибиторов JAK/STAT и других противовоспалительных и/или иммунодепрессантных агентов.
7. Фармацевтический комбинированный продукт по п.6, в котором терапевтически активный агент выбран из глюкокортикоидов, НПВП, циклофосаида, нитрозомочевин, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пурина, аналогов пиримидина, метотрексата, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, мириоцина, такролимуса, сиролимуса, производных микофеноловой кислоты, финголимода и других модуляторов сфингозин-1-фосфатных рецепторов, моноклональных и/или поликлональных антител против таких мишеней, как провоспалительные цитокины и провоспалительные рецепторы цитокинов, T-клеточный рецептор и интегрин.
8. Фармацевтический комбинированный продукт по любому из пп.1-7, в котором компоненты (i) и (ii) объединены в лекарственную форму в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или средства галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.
9. Применение фармацевтического комбинированного продукта по любому из пп.1-8 в качестве лекарственного средства.
10. Применение фармацевтического комбинированного продукта по любому из пп.1-8 в способе лечения фиброзного заболевания.
11. Применение по п.10, в котором фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, яичек, яичников, надпочечников, артерий, вен, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или брюшинного пространства), костного мозга, суставов и желудка, в частности фиброза печени, ЖКТ, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей, костного мозга, кишечника и суставов.



Фиг. 1

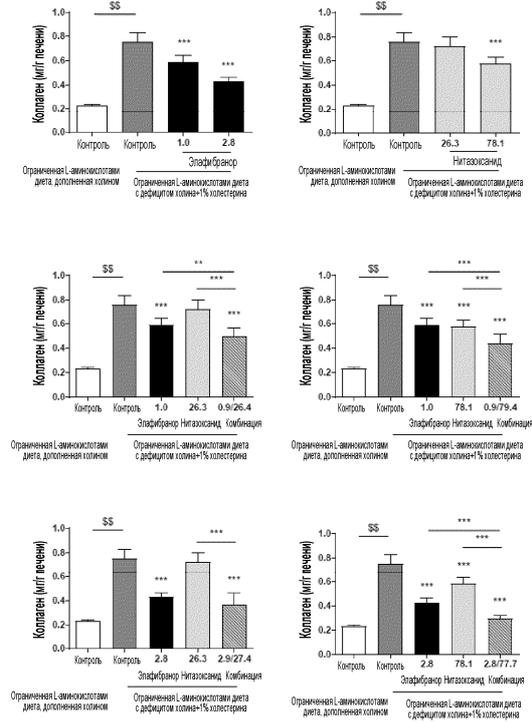


Фиг. 2



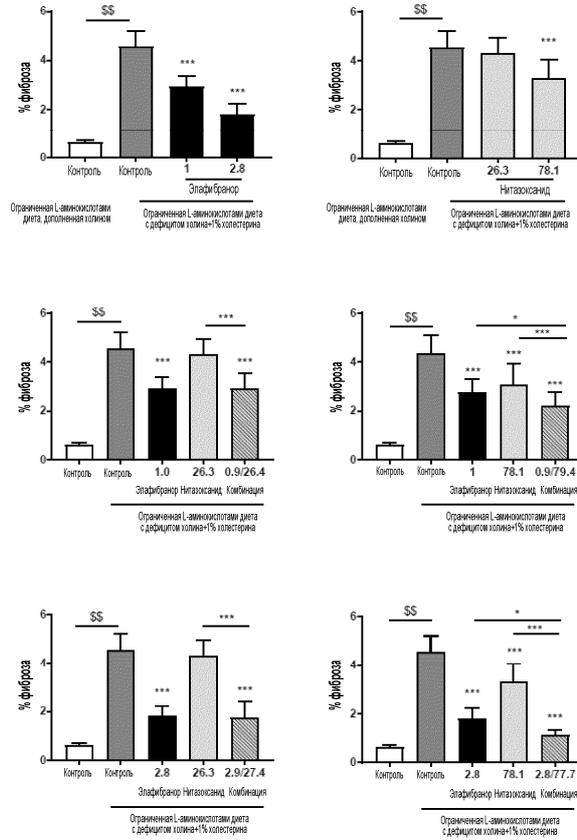
Фиг. 3

Печеночный коллаген



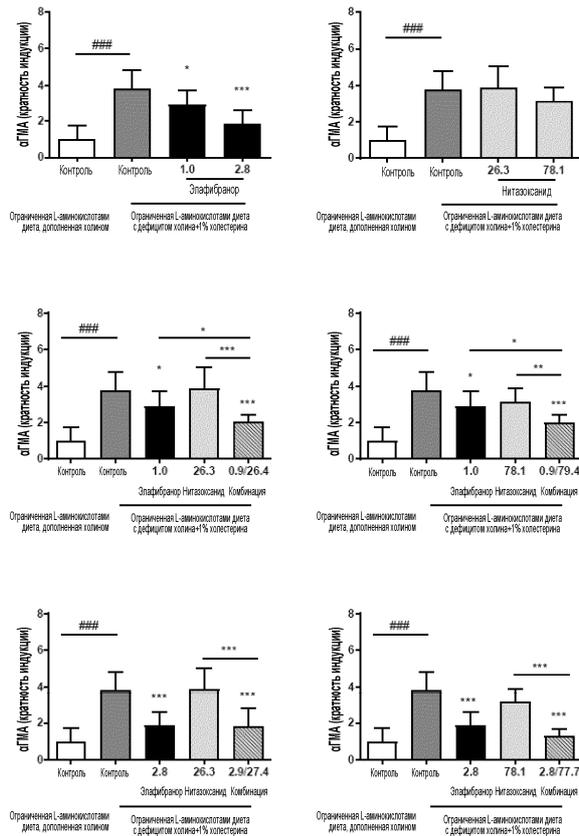
Фиг. 4

Гистология



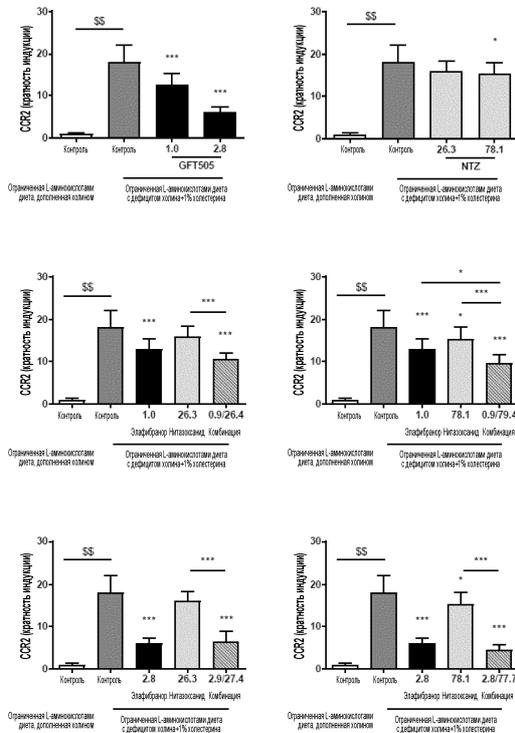
Фиг. 5

Экспрессия гена α ГМА в печени



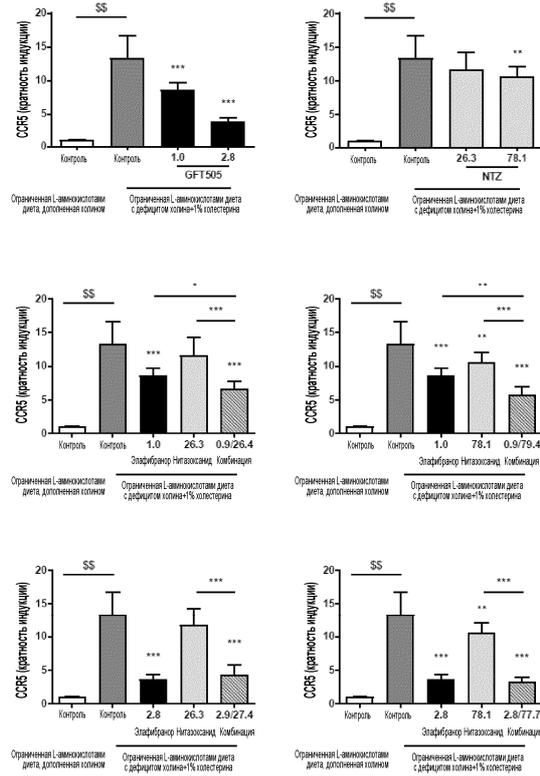
Фиг. 6

Экспрессия гена CCR2 в печени



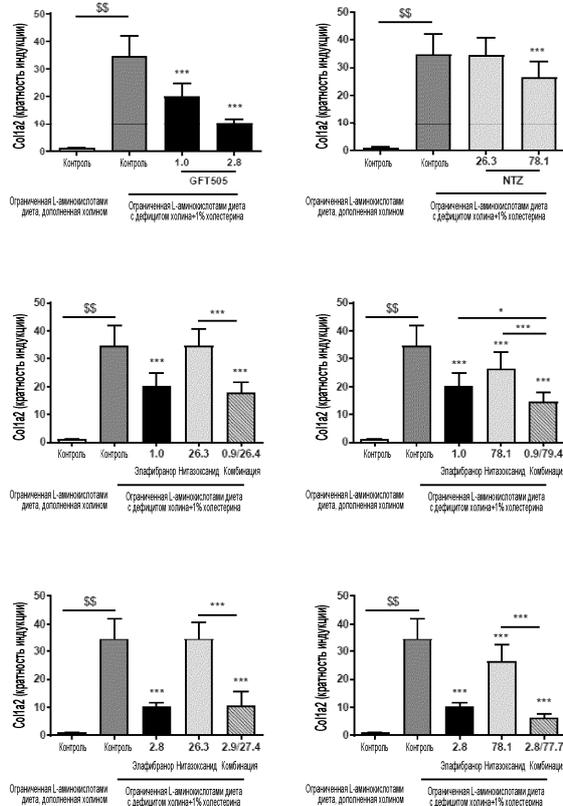
Фиг. 7

Экспрессия гена CCR5 в печени



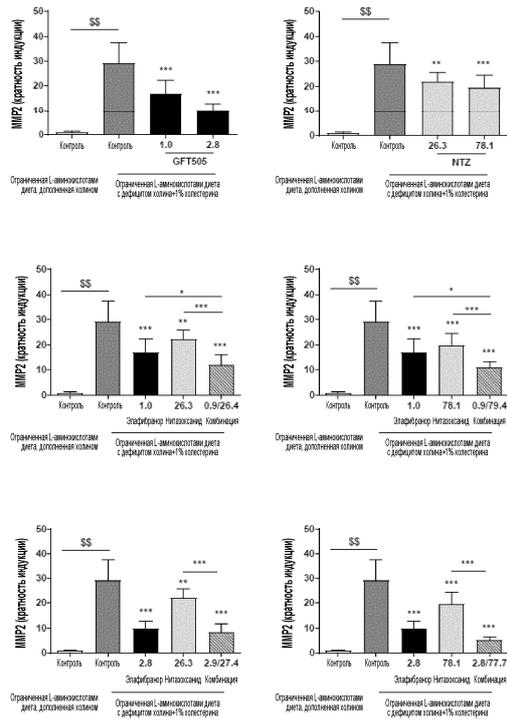
Фиг. 8

Экспрессия гена Col1a2 в печени



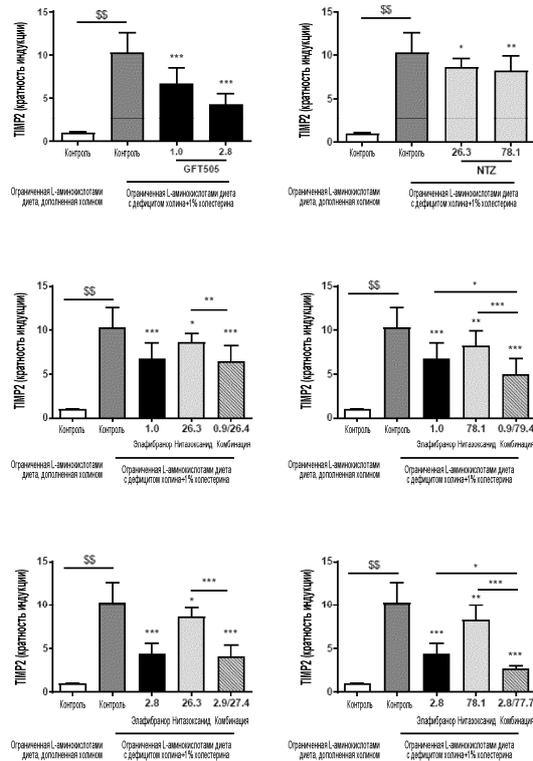
Фиг. 9

Экспрессия гена MMP2 в печени



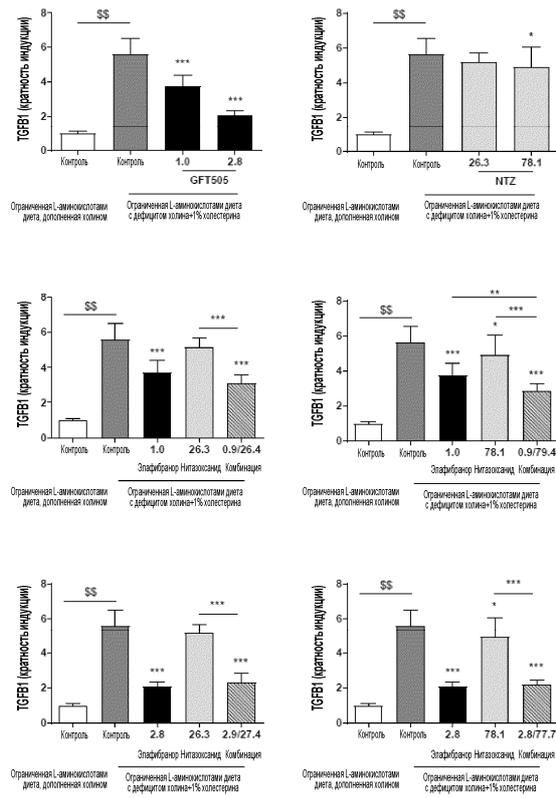
Фиг. 10

Экспрессия гена TIMP2 в печени



Фиг. 11

Экспрессия гена TGFb1 в печени



Фиг. 12

