

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042734**

(13) **B1**

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

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.20 | (51) Int. Cl. <i>A61K 31/192</i> (2006.01)
<i>A61K 31/194</i> (2006.01)
<i>A61K 31/5375</i> (2006.01)
<i>A61K 45/06</i> (2006.01)
<i>A61K 31/435</i> (2006.01)
<i>A61K 31/444</i> (2006.01)
<i>A61P 1/16</i> (2006.01)
<i>A61P 17/02</i> (2006.01)
<i>A61P 29/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201992475 | |
| (22) Дата подачи заявки
2018.04.18 | |

(54) **КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ТАКОЙ АГОНИСТ РРАР, КАК ЭЛАФИБРАНОР И ИНГИБИТОР АЦЕТИЛ-КоА-КАРБОКСИЛАЗЫ (АКК)**

- | | |
|--|------------------------------|
| (31) 17305452.9; 18305150.7 | (56) WO-A1-2016112305 |
| (32) 2017.04.18; 2018.02.13 | |
| (33) EP | |
| (43) 2020.02.17 | |
| (86) PCT/EP2018/059969 | |
| (87) WO 2018/193007 2018.10.25 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЖЕНФИТ (FR) | |
| (72) Изобретатель:
Вальчак Роберт, Беланже Кароль,
Легри Ванесса, Ноэль Бенуа, Декам
Эмелин, Видаль Гийом, Вальчак
Матильд, Дельбар Изабель (FR) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к комбинированному лекарственному препарату и его применению в терапии.

B1

042734

042734

B1

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

1-[4-Метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксихиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-он (элафибранор или ELA, ранее называвшийся GFT505), раскрытый в патентном документе WO 2004/005233, обладает свойствами, которые могут быть полезны для лечения ряда гастроэнтерологических заболеваний и заболеваний печени, в частности холестатических заболеваний, например ПБХ (первичный билиарный холангит) и ПСХ (первичный склерозирующий холангит), или заболеваний печени, в частности неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), например неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).

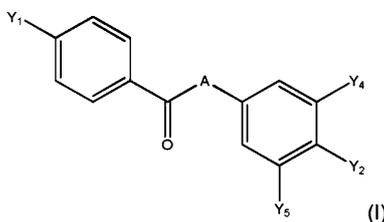
Элафибранор был протестирован на клиническую эффективность при НАСГ в годичном исследовании 2b фазы по данным биопсии печени (GFT505-212-7), одном из крупнейших интервенционных исследований, когда-либо проводившихся в отношении НАСГ. На сегодняшний день более чем у 800 пациентов и здоровых добровольцев элафибранор продемонстрировал полезные свойства в отношении НАСГ, включая, в частности, изменение к лучшему маркеров дисфункции печени, включая АЛТ, АСТ, γ ГТФ, ЩФ; улучшение чувствительности к инсулину и гомеостаза глюкозы; благоприятные эффекты на липиды в плазме, в том числе снижение уровня триглицеридов в плазме и Х-ЛПНП, а также повышение уровня Х-ЛПВП; противовоспалительные свойства; эффективность по гистологическим параметрам НАСГ (стеатоз, воспаление, фиброз) на животных моделях болезней и антифиброзную активность. Отсутствие проблем безопасности было подтверждено в полном токсикологическом анализе до двухлетних исследований канцерогенности. В настоящее время элафибранор оценивается в 3 фазе клинических исследований для лечения НАСГ. Во 2 фазе клинических исследований также запланирована оценка данной молекулы для лечения ПБХ.

Ввиду своего хорошего терапевтического и фармакологического профиля элафибранор является весьма перспективной молекулой, которая потенциально может использоваться в комбинированных фармакологических подходах для нацеливания на параллельные или комплементарные ключевые пути, вовлеченные в большое количество воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированному лекарственному препарату, содержащему:

(i) агонист PPAR, в частности соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль:



где 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, идентичные или отличающиеся друг от друга, 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 несколькими атомами галогена, (C_1-C_6)алкокси- или (C_1-C_6)алкилтиогруппу, (C_3-C_{14})циклоалкильные группы, (C_3-C_{14})циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

Rb представляет собой (C_1-C_6)алкильную группу, замещенную по меньшей мере группой $-COORc$, где Rc представляет собой атом водорода или (C_1-C_6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C_3-C_{14})циклоалкильные группы, или гетероциклические группы; и

Y_4 и Y_5 , идентичные или отличающиеся друг от друга, представляют собой (C_1-C_6)алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, (C_3-C_{14})циклоалкильные группы или гетероциклические группы;

(ii) анти-НАСГ, антифиброзный или антихолестатический агент.

В конкретном варианте осуществления соединение по формуле (I):

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

A представляет собой группу $CH=CH$;

Y_2 представляет собой группу Gb-Rb;

Ga и Gb, идентичные или отличающиеся друг от друга, представляют собой атом кислорода или серы;

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

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

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

В конкретном варианте осуществления соединение по формуле (I):

Y₁ представляет группу Ra или Ga-Ra;

A представляет собой группу CH₂-CH₂;

Y₂ представляет собой группу Gb-Rb;

Ga представляет собой атом кислорода или серы и Gb представляет собой атом кислорода;

Ra представляет собой (C₁-C₆)алкильную или (C₃-C₁₄)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;

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

В конкретном варианте осуществления соединения по формуле (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 и Gb представляет собой атом кислорода;

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

Rb представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу, замещенную или не замещенную одним или несколькими атомами галогена и замещенную по меньшей мере группой -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 в соединении по формуле (I) Gb представляет собой атом кислорода и 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 в соединении по формуле (I) Y₁ представляет собой (C₁-C₆)алкилтиогруппу, которая содержит (C₁-C₆)алкильную группу, которая является линейной или разветвленной, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена.

В конкретном варианте осуществления соединения по формуле (I) выбрано из группы, состоящей из:

1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она (элафибранора или GFT505),

1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,

1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,

1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,

1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,

1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]-проп-2-ен-1-она,

1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,

2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксипропил]фенокси]-2-метилпропановой кислоты и изопропилового эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксипропил]фенокси]-2-метилпропановой кислоты.

В конкретном варианте осуществления изобретения компонент (ii) представляет собой анти-НАСГ агент. Иллюстративные, не ограничивающие анти-НАСГ агенты, полезные в практике осуществления настоящего изобретения, включают:

ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы;

агонисты аденозиновых рецепторов A₃;

антагонисты альдостерона и антагонисты минералокортикоидов;

стимулятор АМФ-активируемой протеинкиназы

агонист рецепторов амилина и агонисты рецепторов кальцитонина;

ингибиторы ангиопоэтин-подобного белка 3;

анти-ЛПС антитела;

ингибиторы апикального натрий-зависимого переносчика желчных кислот;

бетаин безводный или RM-003;

биологически активные липиды;
 антагонисты каннабиноидных CB1-рецепторов;
 двойной ингибитор каннабиноидных CB1-рецепторов/iNOS;
 ингибиторы каспазы;
 ингибиторы катепсина;
 антагонисты ССК;
 модуляторы хемокинового ССК3 и ингибиторы лиганда эотаксина 2;
 ингибиторы диацилглицерин О-ацилтрансферазы (дГат);
 ингибиторы дипептидилпептидазы IV (дПП4);
 агонисты лиганда инсулина и инсулиновых рецепторов;
 сенсibilизатор инсулина и антагонист рецепторов МНС-1;
 ингибиторы NOX (НадФН-оксидазы), например двойные ингибиторы NOX 1 и 4;
 модуляторы белка внеклеточного матрикса;
 ингибиторы стеароил-Коа-десатуразы-1/конъюгаты жирных и желчных кислот (FABAC);
 ингибиторы синтазы жирных кислот (FAS);
 лиганды рецепторов фактора роста фибробластов 19 (FGF-19), например рекомбинантный белок фактора роста фибробластов 19 (FGF-19) или функциональный сконструированный вариант белка FGF-19;
 лиганды рецепторов фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), например белок фактора роста фибробластов 21 (FGF-21) или функциональный сконструированный вариант белка FGF-21;
 агонисты фарнезоидных X-рецепторов (FXR);
 ингибиторы галектина 3;
 аналоги глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и агонисты рецепторов ГПП-1;
 модуляторы сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR);
 антагонист сопряженных с G-белком рецепторов 84, ингибитор лиганда фактора роста соединительной ткани и агонисты рецепторов свободной жирной кислоты 1;
 ингибиторы сигнального пути Hedgehog в клетках;
 ингибиторы интегрина;
 ингибиторы кетогексокиназы, ингибиторы лейкотриенов (LT)/фосфодиэстеразы (ФдЭ)/липоксигеназы (LO);
 ингибиторы гомолога лизилоксидазы 2 (ингибиторы LOXL2);
 макролиды;
 модулятор метил-СpG-связывающего белка и ингибиторы трансклутаминазы;
 антагонисты микроРНК;
 ингибитор семейства митохондриальных носителей и ингибитор митохондриального белка-носителя фосфата;
 моноклональные антитела;
 ингибиторы миелопероксидазы;
 модуляторы mTOR;
 стимулятор Nad-зависимой деацетилазы сиртуин-1;
 ингибитор ФдЭ-5;
 агонисты рецепторов никотиновой кислоты (GPR109);
 лиганды ядерных рецепторов;
 агонисты белка P2Y₁₃;
 стимуляторы фенилаланин-гидроксилазы;
 антагонисты рецепторов, активируемых протеазами (PAR)-2;
 модуляторы протеинкиназы;
 агонисты PPAR-альфа;
 агонисты PPAR-гамма;
 агонисты PPAR-дельта;
 агонисты PPAR-альфа/гамма;
 агонисты PPAR-альфа/дельта;
 PPAR-гамма/дельта;
 агонисты PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонисты PPAR;
 ингибиторы Rho-ассоциированной протеинкиназы 2 (ROCK2);
 ингибиторы натрий-глюкозного транспортера (SGLT) 1;
 ингибиторы натрий-глюкозного транспортера (SGLT) 2;
 ингибиторы стеароил-Коа-десатуразы-1;
 ингибиторы регулирующей сигналы киназы 1 (ASK1);
 агонисты тиреоидных β-рецепторов (THR β);
 антагонисты толл-подобных рецепторов 2 (TLR-2);
 антагонисты толл-подобных рецепторов 4 (TLR-4);

ингибиторы естественных киллерных Т-клеток I типа;
 модуляторы рецепторов тирозинкиназы (RTK);
 ингибиторы анионообменника уратов 1 и ингибиторы ксантиноксидазы;
 ингибиторы белка сосудистой адгезии-1 (VAP-1) и
 агонисты рецепторов витамина D (VDR).

В дополнительном конкретном варианте осуществления изобретения компонент (ii) представляет собой анти-НАСГ агент.

В конкретном варианте осуществления анти-НАСГ агент выбран из:

ингибиторов ацетил-Коа-карбоксилазы;
 анти-ЛПС антител;
 ингибиторов апикального натрий-зависимого переносчика желчных кислот;
 биологически активных липидов;
 антагонистов каннабиноидных CB1-рецепторов;
 двойного ингибитора каннабиноидных CB1-рецепторов/iNOS;
 ингибиторов каспазы;
 ингибиторов катепсина;
 антагонистов ССК;
 ингибиторов диацилглицерин О-ацилтрансферазы (дГАТ);
 ингибиторов дипептидилпептидазы IV (дПП4);
 ингибиторов NOX (НадФН-оксидазы), например двойных ингибиторов NOX 1 и 4;
 модуляторов белка внеклеточного матрикса;
 ингибиторов стеароил-Коа-десатуразы-1/конъюгатов жирных и желчных кислот (FABAC);
 лигандов рецепторов фактора роста фибробластов 19 (FGF-19), например рекомбинантного белка фактора роста фибробластов 19 (FGF-19) или функционального сконструированного варианта белка FGF-19;

лигандов рецепторов фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), например белка фактора роста фибробластов 21 (FGF-21) или функционального сконструированного варианта белка FGF-21;

агонистов фарнезоидных X-рецепторов (FXR);
 ингибиторов галектина 3;
 аналогов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1);
 модуляторов сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR);
 ингибиторов интегрина;
 ингибиторов лейкотриенов (LT)/фосфодиэстеразы (ФдЭ)/липоксигеназы (LO);
 макролидов;

антагонистов микроРНК,
 моноклональных антител;
 модуляторов mTOR;
 лигандов ядерных рецепторов;
 агонистов белка P2Y₃;
 антагонистов рецепторов, активируемых протеазами (PAR)-2;

модуляторов протеинкиназы;
 агонистов PPAR-альфа;
 агонистов PPAR-гамма;
 агонистов PPAR-дельта;
 агонистов PPAR-альфа/гамма;
 агонистов PPAR-альфа/дельта;
 PPAR-гамма/дельта;

агонистов PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонистов PPAR;
 ингибиторов Rho-ассоциированной протеинкиназы 2 (ROCK2);
 ингибиторов натрий-глюкозного транспортера (SGLT) 2;
 ингибиторов регулирующей сигналы киназы 1 (ASK1);
 агонистов тиреоидных β-рецепторов (THR β);
 антагонистов толл-подобных рецепторов 4 (TLR-4);
 модуляторов рецепторов тирозинкиназы (RTK);
 ингибиторов белка сосудистой адгезии-1 (VAP-1) и
 агонистов рецепторов витамина D (VDR).

Другие анти-НАСГ агенты включают KB-GE-001 и NGM-386, а также NGM-395, NC-10 и TMC-606F. Дополнительные анти-НАСГ агенты включают икосабутат, NC-101, NAIA-101, колесевелам и PRC-4016.

В конкретном варианте осуществления изобретения компонент (ii) представляет собой антифиброзный агент. Иллюстративные, не ограничивающие антифиброзные агенты, полезные в практике осуществления настоящего изобретения, включают:

агонисты аденозиновых рецепторов А3;
 блокаторы рецепторов ангиотензина II
 антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на трансформирующий фактор роста бета 2 (TGF-β2);

биологически активные липиды;
 ингибиторы каспазы;
 миметики каннабиноидных CB2-рецепторов;
 двойные агонисты фарнезоидных X-рецепторов (FXR)/TGR5;
 ингибиторы NOX (надФн-оксидазы), например, двойные ингибиторы NOX 1 и 4;
 ингибиторы галектина 3;
 ингибиторы сигнального пути Hedgehog в клетках;
 иммуномодуляторы;
 ингибиторы интегрина;
 модуляторы макрофагальных маннозных рецепторов;
 стимуляторы металлопротеиназ-9 (MMP-9);
 моноклональные антитела;
 ингибиторы NF-каппа-B;
 нестероидные противовоспалительные препараты (нПВП);
 модуляторы PDGFR;
 агонисты PPAR-альфа;
 агонисты PPAR-гамма;
 агонисты PPAR-дельта;
 агонисты PPAR-альфа/гамма;
 агонисты PPAR-альфа/дельта;
 PPAR-гамма/дельта;
 агонисты PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонисты PPAR.

В другом конкретном варианте осуществления антифиброзный агент выбран из группы, состоящей из:

антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на трансформирующий фактор роста бета 2 (TGF-β2);

биологически активных липидов;
 ингибиторов каспазы;
 миметиков каннабиноидных CB2-рецепторов;
 двойных агонистов фарнезоидных X-рецепторов (FXR)/TGR5;
 ингибиторов NOX (надФн-оксидазы), например, двойных ингибиторов NOX 1 и 4;
 ингибиторов галектина 3;
 иммуномодуляторов;
 ингибиторов интегрина;
 модуляторов макрофагальных маннозных рецепторов;
 стимуляторов металлопротеиназ-9 (MMP-9);
 моноклональных антител;
 ингибиторов NF-каппа-B;
 нестероидных противовоспалительных препаратов (нПВП)
 модуляторов PDGFR;
 агонистов PPAR-альфа;
 агонистов PPAR-гамма;
 агонистов PPAR-дельта;
 агонистов PPAR-альфа/гамма;
 агонистов PPAR-альфа/дельта;
 PPAR-гамма/дельта;
 агонистов PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонистов PPAR.

Другие антифиброзные агенты включают HEC-585, INV-240, терапевтическую РНК-интерференцию (Silence Therapeutics) и программу SAMiRNA (Bioneer Corp).

Другие иллюстративные антифиброзные агенты включают пирфенидон или ингибиторы рецепторов тирозинкиназы (RTKI), например нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторы рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитор CTGF, или любое антифиброзное соединение, соединение, способное вмешиваться в TGFβ- и BMP-активируемые пути, включая активаторы латентного комплекса TGFβ, например MMP2, MMP9, THBS1 или интегрин клеточной поверхности, рецепторы TGFβ I типа (TGFβRI) или типа II (TGFβRII) и их лиганды, например TGFβ, активин, ингибин, нодал, антимюллеровский гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы III типа) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие бел-

ки SMAD или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви сигнального пути MAPK, сигнального пути TAK1, сигнального пути Rho ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3-киназы/АКТ, TGF β -индуцированный процесс EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены пути WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGF β .

В конкретном варианте осуществления изобретения компонент (ii) представляет собой антихолестатический агент. Иллюстративные, не ограничивающие антихолестатические агенты, полезные в практике осуществления настоящего изобретения, включают:

- ингибиторы апикального натрий-зависимого переносчика желчных кислот (ASBTi);
- желчные кислоты;
- ингибиторы катепсина;
- антагонисты ССК;
- ингибиторы CD40;
- ингибиторы CD80;
- ингибиторы NOX (НаДФН-оксидазы), например, двойные ингибиторы NOX 1 и 4;
- агонисты фарнезоидных X-рецепторов (FXR);
- рекомбинантный фактор роста фибробластов (FGF) 19;
- ингибиторы лиганда фракталкина;
- ингибиторы натрий-зависимого котранспортера желчных кислот в подвздошной кишке;
- моноклональные антитела;
- агонисты PPAR-альфа;
- агонисты PPAR-гамма;
- агонисты PPAR-дельта;
- агонисты PPAR-альфа/гамма;
- агонисты PPAR-альфа/дельта;
- PPAR-гамма/дельта;
- агонисты PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонисты PPAR.

В конкретном варианте осуществления антихолестатический агент выбран из группы, состоящей из:

- ингибиторов апикального натрий-зависимого переносчика желчных кислот (ASBTi);
- желчных кислот;
- ингибиторов катепсина;
- антагонистов ССК;
- ингибиторов CD40;
- ингибиторов CD80;
- ингибиторов NOX (НаДФН-оксидазы);
- агонистов фарнезоидных X-рецепторов (FXR);
- рекомбинантного фактора роста фибробластов (FGF) 19;
- ингибиторов лиганда фракталкина;
- ингибиторов натрий-зависимого котранспортера желчных кислот в подвздошной кишке;
- моноклональных антител;
- агонистов PPAR-альфа;
- агонистов PPAR-гамма;
- агонистов PPAR-дельта;
- агонистов PPAR-альфа/гамма;
- агонистов PPAR-альфа/дельта;
- PPAR-гамма/дельта;
- агонистов PPAR-альфа/гамма/дельта или пан-агонистов PPAR;

Иллюстративные ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы включают, но не ограничиваются, GS-0976, ND-654, AC-8632, PF05221304, CP640186, гемкабен, МК-4074 и PF05175157.

Иллюстративные агонисты аденозиновых рецепторов А3 включают, но не ограничиваются, 2-(1-гексинил)-N-метиладенозин, пиклиденозон CF-101 (IB-МЕСА), намоденозон CF-102, 2-C1-IB-МЕСА, CP-532,903, инозин, LUF-6000 и MRS-3558.

Иллюстративные антагонисты альдостерона и антагонисты минералокортикоидных рецепторов включают, но не ограничиваются, апараренон (MT 3995), амилорид, спиронолактон, эплеренон, канренол и канреноат калия, прогестерон, дроспиренон, гестоден и бенидипин.

Иллюстративные стимуляторы АМФ-активируемой протеинкиназы включают, но не ограничиваются, PXL-770, MB-11055 дебио-0930В метформин, CNX-012, O-304, кальциевую соль мангиферина, элтромбопаг, каротуксимаб и имеглимин.

Иллюстративный агонист рецепторов амилина и агонисты рецепторов кальцитонина, включают, но не ограничиваются, KBP-042 и KBP-089.

Иллюстративные ингибиторы ангиопоэтин-подобного белка 3 включают, но не ограничиваются, ARO-ANG3, IONIS-ANGGPTL3-LRx или AKCEA-ANGPTL3LRx, эвинакумаб и ALN-ANG.

Согласно изобретению, термин "антагонисты рецепторов ангиотензина 1-го типа" в контексте данного документа включает, но не ограничивается, ирбесартан.

Согласно изобретению, термин "анти-ЛПС антителя" в контексте данного документа включает, но не ограничивается, IMM-124-E.

Иллюстративные антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на трансформирующий фактор роста бета 2, включают, но не ограничиваются, ASPH-0047, IMC-TR1 и ISTH-0047.

Иллюстративный ингибитор апикального натрий-зависимого транспортера желчных кислот включает, но не ограничивается, A-4250, воликсibat, мараликсibat, ранее SHP-625, GSK-2330672, элобиксibat и CJ-14199.

Иллюстративные желчные кислоты включают, но не ограничиваются, обетихолевую кислоту (ОХК) и УДХК, норурсодезоксихолевую кислоту и урсодиол.

Иллюстративные биоактивные липиды включают, но не ограничиваются ими, 5-гидроксиэйкозапентаеновую кислоту (15-HEPE, DS-102).

В дополнительном конкретном варианте осуществления биологически активный липид может быть выбран из ненасыщенных жирных кислот, например 25 арахидоновой кислоты, икосапентэтилового эфира, эйкозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

Иллюстративные антагонисты каннабиноидных CB1-рецепторов включают, но не ограничиваются, намацизумаб, GRC-10801, MRI-1569, MRI-1867, DBPR-211, AM-6527: AM-6545, NESS-11-SM, CXB-029, GCC-2680, TM-38837, Org-50189, PF-514273, BMS-812204, ZYO-1, AZD-2207, AZD-1175, отенабант, ибипинабант, суринабант, римонабант, дринабант, SLV-326, V-24343 и O-2093.

Иллюстративные миметики каннабиноидных CB2-рецепторов включают, но не ограничиваются, анабасум (ресунаб, JKT-101).

Иллюстративные ингибиторы каспазы включают, но не ограничиваются, эмрикасан, белнакасан, нивокасан, IDN-7314, F-573, VX-166, YJP-60107, MX-1122, IDN-6734, TLC-144, SB-234470, IDN-1965, VX-799, SDZ-220-976 и L-709049.

Иллюстративные ингибиторы катепсина включают, но не ограничиваются, VBY-376, VBY-825, VBY-036, VBY-129, VBY-285, Org-219517, LY3000328, RG-7236 и BF/PC-18.

Иллюстративные антагонисты ССК включают, но не ограничиваются, антагонисты ССК2/5, например, ценикривирок; PG-092, RAP-310, INCB-10820, RAP-103, PF-04634817 и ССХ-872.

Иллюстративные ингибиторы CD40 включают, но не ограничиваются, FFP-104, x1-050, DOM-0800, XmAb-5485, KGYU-15, FFP-106, TDI-0028 и ABI-793.

Иллюстративные ингибиторы CD80 включают, но не ограничиваются, рудекс, FPT-155, толеримаб, галиксимаб, SCH-212394, IGM-001, ASP-2408 и SCH-204698.

Иллюстративные модуляторы хемокинового ССК3 и ингибиторы лиганда эотаксина 2 включают, но не ограничиваются, бертилимумаб, CM-101 (гуманизированный), CM-102 и RNS-60.

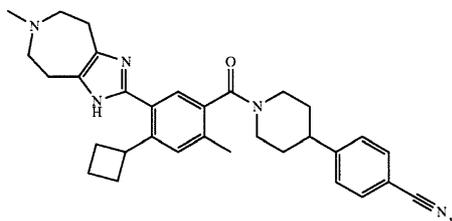
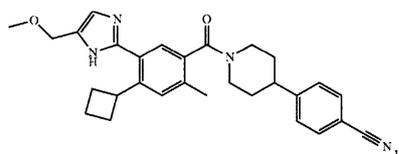
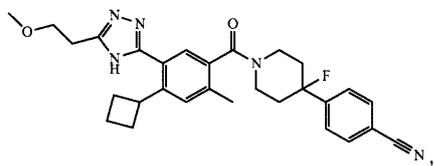
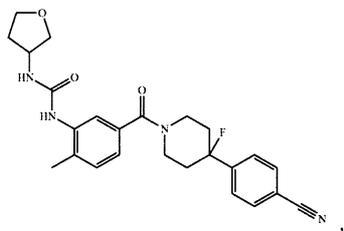
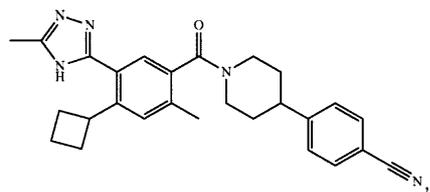
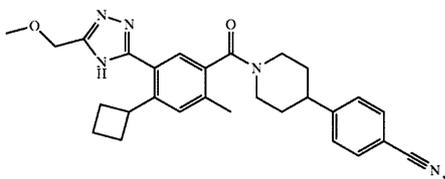
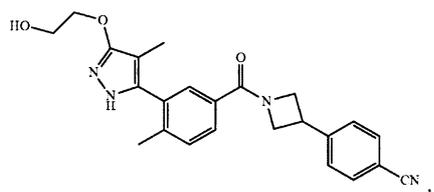
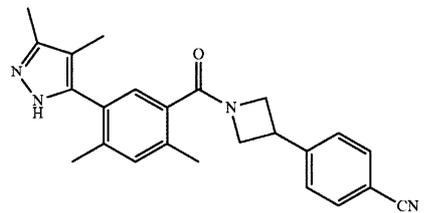
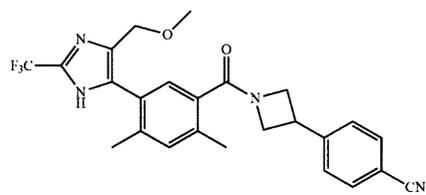
Иллюстративные ингибиторы диацилглицерин О-ацилтрансферазы включают, но не ограничиваются, IONIS-DGAT2Rx (ранее ISIS-DGAT2Rx), LY-3202328, BH-03004, KR-69530, OT-13540, AZD-7687, PF-06865571, PF-06424439 и АВТ-046.

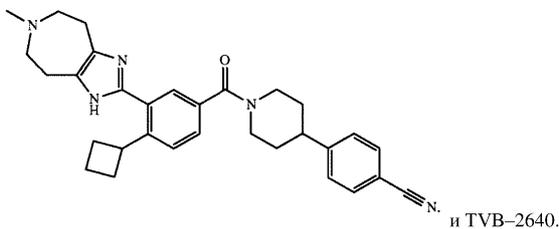
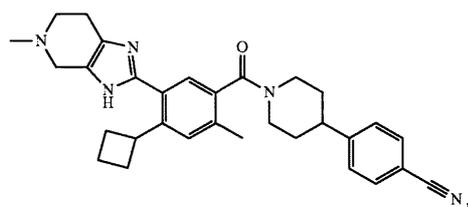
Иллюстративные ингибиторы дипептидилпептидазы IV включают, но не ограничиваются, эвоглиптин, видаглиптин, фотаглиптин, алоглиптин, саксаглиптин, тилоглиптин, анаглиптин, ситаглиптин, ретаглиптин, мелоглиптин, госоглиптин, трелаглиптин, тенелиглиптин, дутоглиптин, линаглиптин, гемиглиптин, йоглиптин, бетаглиптин, имиглиптин, омариглиптин, видаглиптин и денаглиптин.

Иллюстративные ингибиторы синтазы жирных кислот (FAS) включают, но не ограничиваются, TVB-2640; TVB-3664; TVB-3166, TVB-3150, TVB-3199, TVB-3693BZL-101, 2-октадециновую кислоту, MDX-2, фасналл, MT-061, G28UCM, MG-28, HS-160, GSK-2194069, KD-023, циклостазол.

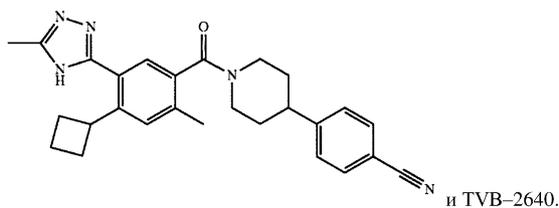
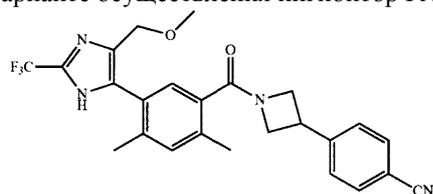
В конкретном варианте осуществления ингибитор FAS представляет собой соединение, выбранное из следующего списка соединений:

042734





и TVB-2640.
В другом конкретном варианте осуществления ингибитор FAS выбран из:



и TVB-2640.
В конкретном варианте осуществления ингибитор FAS представляет собой TVB-2640.

Иллюстративные агонисты фарнезоидных X-рецепторов (FXR)/TGR5 включают, но не ограничиваются, INT-767.

Иллюстративные ингибиторы NOX (НАДФН-оксидазы) включают, но не ограничиваются, двойные ингибиторы NOX 1 и 4; GKT-831 (2-(2-хлорфенил)-4-[3-(диметиламино)фенил]-5-метил-1H-пиразоло[4,3-с]пиридин-3,6(2H,5H)-дион, ранее GKT137831 и GKT-901.

Иллюстративные модуляторы белка внеклеточного матрикса включают, но не ограничиваются, CNX-024, CNX-025 и SB-030.

Иллюстративные агонисты фарнезоидных X-рецепторов (FXR) включают, но не ограничиваются, обетихоловую кислоту (ОХК), GS-9674, LJM-452 или LJM452, LMB763, EDP-305, AKN-083, INT-767, GNF-5120, LY2562175, INV-33, NTX-023-1, EP-024297, Pх-103 и SR-45023.

Иллюстративные ингибиторы лиганда фракталкина включают, но не ограничиваются, E-6011 и KAN-0440567.

Иллюстративный лиганд рецепторов фактора роста фибробластов 19 (FGF-19), рекомбинантный белок фактора роста фибробластов 19 (FGF-19) или функциональный сконструированный вариант FGF-19 включают, но не ограничиваются, NGM-282.

Иллюстративный лиганд рецепторов фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), белок фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), включает, но не ограничивается, PEG-FGF21 (ранее BMS-986036), YH-25348, BMS-986171, YH-25723, LY-3025876 и NNC-0194-0499.

Иллюстративные ингибиторы галектина 3 включают, но не ограничиваются, GR-MD-02, TD-139, ANG-4021, галектин-3С, LJPC-201, TFD-100, GR-MD-03, GR-MD-04, GM-MD-01, GM-CT-01, GM-CT-02, Gal-100 и Gal-200.

Иллюстративные аналоги глюкагоноподобного пептида (ГПП-1) включают, но не ограничиваются, семаглутид, лираглутид, эксенатид, албиглутид, дулаглутид, ликсисенатид, локсенатид, эфпегленатид, таспоглутид, MKC-253, DLP-205 и ORMD-0901

Иллюстративные агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) включают, но не ограничиваются, LY-3305677 и оксинтомодулин длительного действия.

Иллюстративные модуляторы сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), включают, но не ограничиваются, CNX-023.

Иллюстративный антагонист сопряженных с G-белком рецепторов 84 (антагонист GPR84), ингибитор лиганда фактора роста соединительной ткани и агонист рецепторов свободной жирной кислоты 1 (агонист FFAR1) включают, но не ограничиваются, PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283 и PBI-4299.

Иллюстративные ингибиторы сигнального пути Hedgehog в клетках включают, но не ограничиваются, висмодегиб, TAK-441, IPI-926, саридегиб, сонидегиб/эрисмодегиб, BMS-833923/XL139, PF-04449913, таладегиб/LY₂940680, ETS-2400, SHR-1539 и CUR61414.

Иллюстративные ингибиторы натрий-зависимого котранспортера желчных кислот в подвздошной кишке включают, но не ограничиваются, A-4250, GSK-2330672, воликсibat, CJ-14199 и элобиксibat.

Иллюстративные иммуномодуляторы включают, но не ограничиваются, PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283, PBI-4299 и AIC-649.

Иллюстративный сенсibilизатор инсулина и агонист рецепторов МНС-1 включают, но не ограничиваются, MSDC-0602k, MSDC-0602, CSTI-100 и AMRI.

Иллюстративные ингибиторы интегрин включают, но не ограничиваются, ингибиторы интегрин фирмы "Pliant Therapeutic", ингибиторы интегрин фирмы "Indalo Therapeutics", ингибиторы интегрин Сент-Луисского университета, ProAgio и GSK-3008348.

Иллюстративные ингибиторы кетогексокиназы включают, но не ограничиваются, JNJ-28165722; JNJ-42065426; JNJ-42152981; JNJ-42740815; JNJ-42740828 и PF-06835919.

Иллюстративные ингибиторы лейкотриенов/фосфодиэстеразы/липоксигеназы включают, но не ограничиваются, тилелукаст (ранее MN-001), томелукаст, сулукаст, масилукаст, зафирлукаст, пранлукаст, монтелукаст, гемилукаст, верлукаст, аклукаст, побиликаст, циналукаст и иралукаст.

Иллюстративные ингибиторы гомолога лизилоксидазы 2 включают, но не ограничиваются, раппапорт, интермун, фармаксис, АВ-0023, симтузумаб, PXS-5382А и PXS-5338.

Иллюстративные макролиды включают, но не ограничиваются, солитромицин, азитромицин и эритромицин.

Иллюстративные модуляторы макрофагальных маннозных рецепторов включают, но не ограничиваются, АВ-0023, МТ-1001, [18F]FB18mHSA, ксемис, технеций Тс 99m тильманоцепт и CDX-1307.

Иллюстративные модулятор метил-СрG-связывающего белка и ингибиторы трансглутаминазы включают, но не ограничиваются, цистеамин, ЕС цистеамин, цистеамина битартрат с энтеросолюбильным покрытием, цистеамина битартрат (с энтеросолюбильным покрытием), бенну, цистеамина битартрат (с энтеросолюбильным покрытием), раптор, цистеамина битартрат, DR цистеамин, энтеросолюбильный цистеамина битартрат с отсроченным высвобождением, меркаптамин, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), бенну, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), раптор, RP-103, RP-104, процисби и меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием).

Иллюстративные антагонисты miRNA включают, но не ограничиваются, RG-125 (ранее AZD4076), RGLS-5040, RG-101, MGN-5804 и MRG-201.

Иллюстративные стимуляторы металлопротеаз-9 (ММР-9) включают, но не ограничиваются, стимулятор ММР-9 Elastomics Ab.

Иллюстративный ингибитор семейства митохондриальных носителей и ингибитор митохондриального белка-носителя фосфата включают, но не ограничиваются, TRO-19622, трофос, олесоксим, RG-6083 или RO-7090919.

Иллюстративные ингибиторы миелопероксидазы включают, но не ограничиваются, PF-06667272.

Иллюстративные моноклональные антитела (мАт) включают, но не ограничиваются, бертилимумаб, NGM-313, мАт, нацеленные на IL-20, фрезолиумаб (анти-TGFβ) (ранее GC1008), тимолумаб, ранее ВТТ-1023, намализумаб, омализумаб, ранибизумаб, бевацизумаб, лебрикизумаб, эпратузумаб, фелвизумаб, матузумаб, монализумаб, реслизумаб, форалумаб (NI-0401, анти-CD3), симтизумаб (GS-6624) мАт против LOXL2, устекинумаб, анти-ФНО-антитело и инебилизумаб

Иллюстративные моноклональные антитела выбраны из группы, состоящей из анти-IL20 мАт, анти-TGFβ антител, анти-CD3 антител, анти-LOXL2 антител и анти-ФНО антител.

Иллюстративные модуляторы mTOR включают, но не ограничиваются, MSDC-0602 и генную терапию на основе ААВ, которую вводят совместно с SVP-сиролимусом.

Иллюстративный стимулятор НАД-зависимой деацетилазы сиртуин-1; ингибитор ФДЭ-5 включают, но не ограничиваются, NS-0200.

Иллюстративные ингибиторы NF-каппа-В включают, но не ограничиваются, LC-280126.

Иллюстративные агонисты рецептора никотиновой кислоты (GPR109) включают, но не ограничиваются, ARI-3037MO, MMF, LUF 6283, ацифран, IBC 293, МК-1903, GSK256073, МК-6892, МК-0354, SLx-4090, ломитапид, лексibuлин, апабеталон, ацифран, ларопипрант, дапоринад, анацетрапид, INCB-19602, ST-07-02, ломефлоксацин, ниацин и ларопипрант с контролируемым высвобождением.

Иллюстративные нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты (НПВП) включают, но не ограничиваются, F-351, салицилаты (аспирин), ацетаминофен, производные пропионовой кислоты (ибупрофен, напроксен), производные уксусной кислоты (индометацин, диклофенак), производные эноловой кислоты (пироксикам, фенилбутазон), производные антралиновой кислоты (меклофеналминовую кислоту, флуфенамовую кислоту), селективные ингибиторы COX-2 (целекоксиб, парекоксиб) и сульфонанилиды (нимесулид).

Иллюстративные лиганды ядерных рецепторов включают, но не ограничиваются, DUR-928 (ранее

DV 928).

Иллюстративные агонисты белка P2Y₁₃ включают, но не ограничиваются, C-209.

Иллюстративные модуляторы PDGFR включают, но не ограничиваются, BOT-501 и BOT-191.

Иллюстративные стимуляторы фенилаланин-гидроксилазы включают, но не ограничиваются, пегвалиазу, сапроптерин, AAV-PAH, CDX-6114 сепиаптерин, RMN-168, ALTU-236, ETX-101, хепастем, ролипрам и аллпростадил.

Иллюстративные агонисты PPAR-альфа включают, но не ограничиваются, фенофибрат, ципрофибрат, пемафибрат, гемфиброзил, клофибрат, бинифибрат, клинофибрат, клофибриновую кислоту, никофибрат, пирифибрат, плафибрид, ронифибрат, теофибрат, токофибрат и SR10171;

Иллюстративные агонисты PPAR-гамма включают, но не ограничиваются, пиоглитазон, дейтерированный пиоглитазон, росиглитазон, эфатуазон, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001 и ALL-4.

Иллюстративные агонисты PPAR-дельта включают, но не ограничиваются, GW501516 (эндурабол или $(\{4-[(\{4\text{-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3\text{-тиазол-5-ил}\} \text{метил} \text{сульфанил}-2\text{-метилфенокси}\} \text{уксусную кислоту})\})$), MBX8025 (селаделпар или $\{2\text{-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметил-фенил)-2H-[1,2,3]триазол-4-илметилсилфанил]фенокси}\}$ уксусную кислоту), GW0742 ($(\{4-[[[2-[3\text{-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метил]тио]-2\text{-метилфенокси}\}] \text{уксусную кислоту})$), L165041, HPP-593 и NCP-1046.

Иллюстративные агонисты PPAR-альфа/гамма (также называемые глитазарами) включают, но не ограничиваются, сароглитазар, алеглитазар, мураглитазар, тесаглитазар и DSP-8658.

В дополнение к элафибрану иллюстративные агонисты PPAR-альфа/дельта включают, без ограничения, T913659.

Иллюстративные агонисты PPAR-гамма/дельта включают, но не ограничиваются, конъюгированную линолевую кислоту (КЛК) и T3D-959.

Иллюстративные агонисты PPAR-альфа/гамма/дельта или "пан-агонисты PPAR", включают, но не ограничиваются, IVA337 (ланифибранор), TTA (тетрадецилтиоуксусную кислоту), бавачинин, GW4148, GW9135, беафибрат, лобеглитазон и CSO38.

Иллюстративные антагонисты рецепторов, активируемых протеазами (PAR)-2, включают, но не ограничиваются, PZ-235 и NP-003.

Иллюстративные модуляторы протеинкиназы включают, но не ограничиваются, CNX-014, MB-11055, ALF-1, мангиферин, амлексанокс, GS-444217, REG-101 и валин.

Иллюстративный ингибиторы Rho-ассоциированной протеинкиназы 2 (ROCK2) включают, но не ограничиваются, KD-025, TRX-101, BA-1049, LYC-53976, INS-117548 и RKI-1447.

Иллюстративные ингибиторы регулирующей сигналы киназы 1 (ASK1) включают, но не ограничиваются, селонсертиб (ранее GS-4997).

Иллюстративные ингибиторы натрий-глюкозного транспортера (SGLT) 1 включают, но не ограничиваются, BX-4212/BX-4211/сотаглифлозин, SAR-439954, LIK-066 (ликоглифозин), LX-2761, GSK-161235, LP-925219, KGA-2727, SAR-7226, SAR-474832, SY-008 и AVX-3030.

Иллюстративные ингибиторы натрий-глюкозного транспортера (SGLT) 2 включают, но не ограничиваются, ремоглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин, эртуглифлозин, сотаглифлозин, ипраглифлозин, тианаглифлозин, канаглифлозин, тофоглифлозин, янаглифлозин, бексаглифлозин, лусеоглифлозин, серглифлозин, NEC-44616, AST-1935 и PLD-101.

Иллюстративные ингибиторы стеарил-КоА-десатуразы-1/конъюгаты жирных и желчных кислот включают, но не ограничиваются, арамхол, GRC-9332, стимхол, SN-2998, GSK-1940029 и XEN-801.

Иллюстративные агонисты P-рецепторов тиреоидного гормона (THR β) включают, но не ограничиваются, VK-2809, MGL-3196, MGL-3745, SKL-14763, собетиром, BCT-304, ZYT-1, MB-07811 и эпротиром.

Иллюстративные антагонисты толл-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR-2) антагонисты включают, но не ограничиваются, CI-201, также известный как VB-201.

Иллюстративные антагонисты толл-подобных рецепторов 4 (TLR-4) включают, но не ограничиваются, налтрексон, JKB-121, также известный как налмефен, M-62812, ресаторвид, дендрофилин, CS-4771, AyuV-1, AyuV-25, NI-0101, EDA-HPVE7 и эриторан.

Иллюстративные ингибиторы естественных киллерных Т-клеток I типа включают, но не ограничиваются, GRI-0621.

Иллюстративные модуляторы рецепторов тирозинкиназы (RTK) включают, но не ограничиваются, CNX-025, KBP-7018, нинтеданиб и сорафениб.

Иллюстративные ингибиторы анионообменника уратов 1 и ингибиторы ксантинооксидазы включают, но не ограничиваются, лезинурад, RLBN-1001, веринурад, KUX-1151 и лезинурад + аллопуринол.

Иллюстративные ингибиторы белка сосудистой адгезии-1 (VAP-1), также называемые медьсодержащие оксидазы 2 (AOC3), включают, но не ограничиваются, BI-1467335, ранее PXS-4728A, CP-664511, PRX-167700, ASP-8232, RTU-1096, RTU-007 и BTT-1023.

Иллюстративные агонисты рецепторов витамина D (VDR) включают, но не ограничиваются, каль-

циферол, альфакальцидол, 1,25-дигидроксивитамин D3, витамин D2, витамин D3, кальцитриол, витамин D4, витамин D5, дигидротахистерол, кальципотриол, такальцитол, 1,24-дигидроксивитамин D3 и парикальцитол.

Согласно настоящему изобретению термин "агонисты PPAR" относится к агонистам рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом, которые представляют собой класс лекарственных препаратов, играющих центральную роль в гомеостазе липидов и глюкозы. PPAR α главным образом влияет на метаболизм жирных кислот, и его активация уровень содержания липидов, тогда как PPAR γ в основном участвует 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 более конкретном варианте осуществления соединение по формуле (I) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат по настоящему изобретению:

компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль;

компонент (ii) выбран из GKT-831, арамола, SHP-625, эмрикасана, сароглитазара, IMM-124-E, GS-9674, NGM-282, A-4250, GR-MD-02, GS-4997, F-351, солитромицина, ремоглифлозина, BTT-1023, IVA-337 (ланифибранора), JKB-121 (налмефена), KD-025, MSDC-0602 или MSDC-0602k, PBI-4050, PEG-FGF21, типелукаста, VK-2809, MGL-3196, GS-0976, RG-125, воликсибата, пиоглитазона, семаглутида, GSK2330672, MBX-8025, CP-640186, селонсертиба, GKT-831, PXS-4728A, висмодегиба, CF-102 (намоденосона), MT-3995 (апараренона), икосапентэтилового эфира, KD-025, DUR-928 и гемкабена, в частности селонсертиба, GKT-831, PXS-4728A, арамола, PBI-4050, MSDC-0602k, VK-2809, MGL-3196, висмодегиба, CF-102 (намоденосона), MT-3995 (апараренона), JKB-121 (налмефена), эмрикасана, KD-025 и DUR-928.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат по настоящему изобретению:

компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль;

компонент (ii) выбран из GKT-831, арамола, SHP-625, эмрикасана, сароглитазара, IMM-124-E, GS-9674, NGM-282, A-4250, GR-MD-02, GS-4997, LFN-452, F-351, солитромицина, ремоглифлозина, BTT-1023, IVA-337 (ланифибранора), JKB-121, KD-025, MSDC-0602, PBI-4050, PEG-FGF21, типелукаста, VK-2809, MGL-3196, GS-0976, пентасы, RG-125, воликсибата, пиоглитазона, урсодезоксихолевой кислоты, семаглутида, GSK2330672 и MBX-8025, в частности из арамола, SHP-625, эмрикасана, сароглитазара, IMM-124-E, GS-9674, NGM-282, A-4250, GR-MD-02, GS-4997, LFN-452, F-351, солитромицина, ремоглифлозина, BTT-1023, IVA-337 (ланифибранора), JKB-121, KD-025, MSDC-0602, PBI-4050, PEG-FGF21, типелукаста, VK-2809, MGL-3196, GS-0976, RG-125, воликсибата, пиоглитазон, урсодезоксихолевой кислоты, семаглутида, GSK2330672 и MBX-8025.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат по настоящему изобретению:

компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль;

компонент (ii) выбран из GKT-831, арамола, SHP-625, эмрикасана, сароглитазара, IMM-124-E, GS-9674, NGM-282, A-4250, GR-MD-02, GS-4997, F-351, солитромицина, ремоглифлозина, BTT-1023, IVA-337 (ланифибранора), JKB-121, KD-025, MSDC-0602, PBI-4050, PEG-FGF21, типелукаста, VK-2809, MGL-3196, GS -0976, пентасы, RG-125, воликсибата, пиоглитазона, семаглутида, GSK2330672 и MBX-8025.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат представляет собой комбинацию ELA и GKT-831, ELA и селонсертиба, ELA и GS-0976 или ELA и пентасы.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат представляет собой комбинацию ELA и GS-0976, ELA и CP-640186, ELA и селонсертиба, ELA и GKT-831 (ранее GKT137831), ELA и BI-1467335/PXS-4728A, ELA и арамола, ELA и PBI-4050, ELA и MSDC-0602k, ELA и VK-2809, ELA и MGL-3196, ELA и висмодегиба, ELA и CF-102 (намоденосона), ELA и MT-3995 (апараренон), ELA и JKB-121 (налмефен), ELA и эмрикасан, ELA и KD-025, ELA и DUR-928 или ELA и гемкабен.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат представляет собой комбинацию ELA и селонсертиба, ELA и GKT-831 (ранее GKT137831), ELA и BI-1467335/PXS-4728A, ELA и арамола, ELA и PBI-4050, ELA и MSDC-0602k, ELA и VK-2809, ELA и MGL-3196, ELA и висмодегиба, ELA и CF-102 (намоденосона), ELA и MT-3995 (апараренона), ELA и JKB-121 (налмефена), ELA и эмрикасана, ELA и KD-025, а также ELA и DUR-928

В дополнительном конкретном варианте данного осуществления компонент (ii) не является ОХК или СВС.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) выбран из ингибитора АКК, ингибитора АСК1,

двойного ингибитора NOX1 и NOX4, ингибитора VAP-1, ингибиторов стеароил-КоА-десатуразы-1/конъюгата жирных и желчных кислот, антагониста GPR84/агониста FFAR1 или иммуномодулятора, модулятора mTOR или сенсibilизатора инсулина, агониста THR β , ингибитора сигнального пути hedgehog, агониста аденозиновых рецепторов A3, антагониста альдостероновых рецепторов, антагониста TLR-4, ингибитора каспазы, ингибитора ROCK2 и лиганда ядерных рецепторов.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль, и компонент (ii) представляет собой ингибитор АКК (в частности, GS-0976 или CP-640186, или гемкабен), ингибитор ASK1 (в частности, селонсертиб), двойной ингибитор NOX1 и NOX4 (в частности, GKT-831, ранее GKT137831), ингибитор VAP-1 (в частности, BI-1467335/PXS-4728A), ингибиторы стеароил-КоА-десатуразы-1/конъюгат жирных и желчных кислот (в частности, арамхол), антагонист GPR84/агонист FFAR1 или иммуномодулятор (в частности, PBI-4050), модулятор mTOR или сенсibilизатор инсулина (в частности, MSDC-0602k), агонист THR β (в частности, VK-2809 или MGL-3196), ингибитор сигнального пути Hedgehog (в частности, висмодегиб), агонисты аденозиновых рецепторов A3 (в частности, CF-102 (намоденосон)), антагонист альдостероновых рецепторов (в частности, MT-3995 (апараренон)), антагонист TLR-4 (в частности, JKB-121 (налмефен)), ингибитор каспазы (в частности, эмрикасан), ингибитор ROCK2 (в частности, KD-025) и лиганд ядерных рецепторов (в частности, DUR-928).

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор ASK1, двойной ингибитор NOX1 и NOX4, ингибитор VAP-1, ингибиторы стеароил-КоА-десатуразы-1/конъюгат жирных и желчных кислот, антагонист GPR84/агонист FFAR1 или иммуномодулятор, модулятор mTOR или сенсibilизатор инсулина, агонист THR β , ингибитор сигнального пути hedgehog, агонист аденозиновых рецепторов A3, антагонист альдостероновых рецепторов, антагонист TLR-4, ингибитор каспазы, ингибитор ROCK2 и лиганд ядерных рецепторов.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль, и компонент (ii) представляет собой ингибитор ASK1 (в частности, селонсертиб), двойной ингибитор NOX1 и NOX4 (в частности, GKT-831, ранее GKT137831), ингибитор VAP-1 (в частности, BI-1467335/PXS-4728A), ингибиторы стеароил-КоА-десатуразы-1/конъюгат жирных и желчных кислот (в частности, арамхол), антагонист GPR84/агонист FFAR1 или иммуномодулятор (в частности, PBI-4050), модулятор mTOR или сенсibilизатор инсулина (в частности, MSDC-0602k), агонист THR β (в частности, VK-2809 или MGL-3196), ингибитор сигнального пути hedgehog (в частности, висмодегиб), агонист аденозиновых рецепторов A3 (в частности, CF-102 (намоденосон)), антагонист альдостероновых рецепторов (в частности, MT-3995 (апараренон)), антагонист TLR-4 (в частности, JKB-121 (налмефен)), ингибитор каспазы (в частности, эмрикасан), ингибитор ROCK2 (в частности, KD-025) и лиганд ядерных рецепторов (в частности, DUR-928).

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор АКК.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой GS-0976, CP-640186 или гемкабен.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой GS-0976.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой CP-640186.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой гемкабен.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор ASK1.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой селонсертиб.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой двойной ингибитор NOX1 и NOX4.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой GKT-831.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор VAP-1.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой BI-1467335/PXS-4728A.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибиторы стеароил-КоА-

десатуразы-1/конъюгат жирных и желчных кислот.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой арамохол.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой антагонист GPR84/агонист FFAR1.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой PBI-4050.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой модулятор mTOR или сенситизатор инсулина.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой, в частности, MSDC-0602k.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой агонист THRβ.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой VK-2809 или MGL-3196.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой VK-2809.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой MGL-3196.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор сигнального пути Hedgehog в клетках.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой висмодегиб.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой агонист аденозиновых рецепторов A3.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой CF-102 (намоденосон).

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой антагонист альдостероновых рецепторов.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой MT-3995 (апараренон).

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой антагонист TLR-4.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой JKB-121 (налмефен).

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой лиганд ядерных рецепторов.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой эмрикасан.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой ингибитор ROCK2.

В более конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой KD-025.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой лиганд ядерных рецепторов.

В конкретном варианте осуществления компонент (i) представляет собой элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и компонент (ii) представляет собой DUR-928.

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один другой терапевтически активный агент, выбранный из ингибиторов JAK/STAT и другого противовоспалительного агента и/или иммуносупрессивного агента.

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

В другом конкретном варианте осуществления комбинация по настоящему изобретению может до-

полнительно содержать по меньшей мере один терапевтически активный агент с известной антифибротической активностью, например пирфенидон или ингибиторы рецепторов тирозинкиназы (RTKI), например нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторы рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитор CTGF, или любое антифиброзное соединение, соединение, способное вмешиваться в TGF β - и BMP-активируемые пути, включая активаторы латентного комплекса TGF β , например MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGF β I типа (TGFBR1) или типа II (TGFBR2) и их лиганды, например, TGF β , активин, ингибин, нодал, антимюллеровский гормон, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы III типа) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие белки SMAD, или члены SMAD-независимых или неканонических путей, включая различные ветви сигнального пути MAPK, сигнального пути TAK1, сигнального пути Rho ГТФаз, пути фосфатидилинозитол-3-киназы/AKT, TGF β -индуцированный процесс EMT или канонические и неканонические сигнальные пути Hedgehog, включая лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены пути WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию сигнализации TGF β .

В конкретном варианте осуществления изобретения другой терапевтически активный агент представляет собой агонист PPAR.

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

В конкретном варианте осуществления другой терапевтически активный агент представляет собой:

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

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

В конкретном варианте осуществления комбинированный лекарственный препарат представляет собой составный комплект, включающих компоненты (i) и (ii), как описано выше, для последовательного, раздельного или одновременного использования.

В дополнительном варианте осуществления компоненты (i) и (ii) составляют в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или с использованием галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

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

Изобретение также относится к раскрытому здесь комбинированному лекарственному препарату для применения в способе лечения заболевания. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества комбинированного лекарственного препарата, описанного здесь. В другом варианте осуществления предусматривается использование комбинированного лекарственного препарата по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания.

В частности, комбинированный лекарственный препарат по настоящему изобретению полезен для лечения заболеваний, например, иммунных, воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний. В конкретном варианте осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), заболеваний печени, вызванных лекарственным средством, заболеваний печени, вызванных алкоголем, заболеваний печени, вызванных возбудителем инфекции, воспалительных заболеваний печени, заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, например, первичного склерозирующего холангита (ПСХ), первичного билиарного холангита (ПБХ), билиарной атрезии, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 3-го типа (ПСВХ3), воспалительных заболеваний кишки, болезни Крона,

язвенного колита, келоида, перенесенного инфаркта миокарда, склеродермии/системного склероза, воспалительных заболеваний, нейродегенеративных заболеваний, раковых заболеваний, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, менингиомы на фоне нейрофиброматоза, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, экзокринных опухолей поджелудочной железы, лейкемии, миелопролиферативных/миелодиспластических заболеваний, мастоцитоза, дерматофибросаркомы, солидных опухолей, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или толстой и прямой кишки, рак предстательной железы, фиброза или цирроза печени любого происхождения, фиброза или цирроза печени, вызванных метаболическими заболеваниями, фиброза или цирроза печени, вызванных НАЖБП, фиброза или цирроза печени, вызванных НАСГ, фиброза или цирроза печени, вызванных алкоголем, фиброза или цирроза печени, вызванных лекарственным средством, фиброза или цирроза печени, вызванных возбудителем инфекции, фиброза или цирроза печени, вызванных паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных вирусной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных двойной HCV- и ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных излучением или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, 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, например ХОБЛ, астмы, эмфиземы, "легких курильщика", туберкулеза, пневмофиброза, идиопатического легочного фиброза (ИЛФ), фиброза сердца, фиброза почки, нефрогенного системного фиброза, фиброза мышцы, фиброза мягкой ткани (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброза костного мозга, артрофиброза, фиброза сухожилия, фиброза хряща, фиброза поджелудочной железы, фиброза матки, фиброза нервной системы, фиброза яичка, фиброза яичника, фиброза надпочечника, фиброза артерии, фиброза вены, фиброза глаза, эндомикардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, массивного прогрессирующего фиброза (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза околоимплантационной области и асбестового пневмокониоза, артрофиброза, адгезивного капсулита.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), заболеваний печени, вызванных лекарственным средством, заболеваний печени, вызванных алкоголем, заболеваний печени, вызванных возбудителем инфекции, воспалительных заболеваний печени, заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, ретенноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, например первичного склерозирующего холангита (ПСХ), первичного билиарного холангита (ПБХ), билиарной атрезии, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 3-го типа (ПСВХЗ), воспалительных заболеваний кишки, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, колоректального рака, фиброза или цирроза печени, вызванных метаболическими заболеваниями, фиброза или цирроза печени, вызванных НАЖБП, фиброза или цирроза печени, вызванных НАСГ, фиброза или цирроза печени, вызванных алкоголем, фиброза или цирроза печени, вызванных лекарственным средством, фиброза или цирроза печени, вызванных возбудителем инфекции, фиброза или цирроза печени, вызванных паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных вирусной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных двойной HCV- и ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных излучением или химиотерапией, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечника (например, тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, например ХОБЛ, астмы, эмфиземы, "легких курильщика", туберкулеза, пневмофиброза, идиопатического легочного фиброза (ИЛФ).

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

Согласно настоящему изобретению термин "аутоиммунные заболевания" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате патологического иммунного ответа организма на вещества и ткани, обычно присутствующие в организме. Заболевание может быть ограничено определенными

органами (например, при диабете I типа или аутоиммунном тиреоидите) или поражать определенную ткань в разных местах (например, при синдроме Гудпасчера, поражении базальной мембраны в легком и почке).

Термин "воспаление" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате защитного ответа, включающего клетки хозяина, кровеносные сосуды и белки, а также другие медиаторы, которые могут служить для устранения причины повреждения клеток/тканей, а также некротических клеток/тканей в результате первоначального инсульта, и начать процесс восстановления. Воспалительная реакция может проявляться болью, жаром, покраснением, отеком, расширением кровеносных сосудов, усилением кровотока и потерей функции.

Согласно настоящему изобретению термины "фиброз", "фиброзное заболевание", "фиброзное расстройство" и соответствующие отклонения от нормы означают патологическое состояние чрезмерного наложения фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Более конкретно, фиброз представляет собой патологический процесс, который включает в себя усиленное образование фиброзного рубца и повышенную секрецию внеклеточного матрикса соединительной тканью в ответ на повреждение ткани. Физиологически отложение соединительной ткани может нарушить строение и функцию соответствующего органа или ткани.

Согласно настоящему изобретению, фиброз или фиброзное расстройство могут быть связаны с любым органом или фиброзом ткани. Иллюстративные, не ограничивающие примеры конкретного фиброза органа включают фиброз печени, кишечника, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечного тракта (например, тонкой кишки), желчных путей, мягкой ткани (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, фиброз сустава или желудка, в частности фиброз печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечного тракта (например, тонкой кишки), желчных путей, мягкой ткани (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, сустава, глаза или желудка.

Согласно настоящему изобретению термины "холестаз", или "холестатическое заболевание", или "холестатическое расстройство" и соответствующие отклонения от нормы означают патологическое состояние, определяемое уменьшением оттока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами или затруднения оттока желчи через внутри- или внепеченочные желчные протоки. Следовательно, клиническое определение холестаза - это любое состояние, при котором сохраняются вещества, которые обычно выводятся с желчью.

В конкретном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечника, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягкой ткани (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, интестинального и суставного (например, коленного сустава, плеча или других суставов) фиброза.

В предпочтительном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легкого, кожи, почки и интестинального фиброза.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подлежащее лечению фиброзное расстройство выбирают из группы, состоящей из следующего неполного списка фиброзных расстройств: неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), пневмофиброза, идиопатического легочного фиброза, фиброза кожи, фиброза глаза (например, капсульного фиброза), эндомикардиального фиброза, средостенного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза, массивного прогрессивного фиброза (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативного фиброза, неопластического фиброза, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей (ХОБЛ, астмы, эмфиземы, "легких курильщика", туберкулеза), фиброза печени, вызванного алкоголем или лекарственным средством, цирроза печени, фиброза печени, вызванного возбудителем инфекции, фиброза печени, вызванного излучением или химиотерапией, нефрогенного системного фиброза, болезни Крона, язвенного колита, келоида, перенесенного инфаркта миокарда, склеродермии/системного склероза, артрофиброза, некоторых форм адгезивного капсулита, хронических фиброзирующих холангиопатий, например первичного склерозирующего холангита (ПСХ) и первичного билиарного холангита (ПБХ), билиарной атрезии, прогрессирующего семейного внутripеченочного холестаза 3-го типа (ПСВХ3), фиброза околоимплантационной области и асбестового пневмокониоза.

Холестаз определяется как уменьшение оттока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами (печеночно-клеточный холестаз) или обструкции оттока желчи через внутри- или внепеченочные желчные протоки (обструктивный холестаз). В клинической практике холестаз представляет собой любое состояние, при котором отток желчи из печени замедляется или блокируется. В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (ПБХ), первичного склерозирующего холангита (ПСХ), внутripеченочного холестаза беременных, прогрессирующего семейного внутripеченочного холестаза, билиарной атрезии, холелитиаза, инфекционного холангита, холангита, связанного с гистиоцитозом из клеток Лан-

герганса, синдрома Алажиля, несиндромальной недостаточности функции желчевыводящих путей, холестаза, вызванного лекарственным средством, и холестаза, связанного с полным парентеральным питанием. В предпочтительном варианте осуществления холестатическим заболеванием является ПБХ или ПСХ, в частности ПБХ.

Примеры воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний, метаболических заболеваний и холестатических заболеваний включают метаболические заболевания печени, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), заболевания печени, вызванные лекарственным средством, заболевания печени, вызванные алкоголем, заболевания печени, вызванные возбудителем инфекции, воспалительные заболевания печени, заболевания печени, опосредованные дисфункцией иммунной системы, дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания, рестеноз, синдром Х, метаболический синдром, диабет, ожирение, гипертензию, хронические холангиопатии, например первичный склерозирующий холангит (ПСХ), первичный билиарный холангит (ПБХ), билиарную атрезию, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 3-го типа (ПСВХ3), воспалительные заболевания кишки, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермию/системный склероз, воспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания, раковые заболевания, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, менингиому на фоне нейрофиброматоза, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, экзокринные опухоли поджелудочной железы, лейкемию, миелопролиферативные/миелодиспластические заболевания, мастоцитоз, дерматофибросаркому, солидные опухоли, включая рак молочной железы, легких, щитовидной железы или толстой и прямой кишки, рак предстательной железы, фиброз или цирроз печени любого происхождения, фиброз или цирроз печени, вызванные метаболическими заболеваниями, фиброз или цирроз печени, вызванные НАЖБП, фиброз или цирроз печени, вызванные НАСГ, фиброз или цирроз печени, вызванные алкоголем, фиброз или цирроз печени, вызванные лекарственным средством, фиброз или цирроз печени, вызванные возбудителем инфекции, фиброз или цирроз печени, вызванные паразитарной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные бактериальной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные вирусной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные HBV-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные HCV-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные ВИЧ-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные двойной HCV- и ВИЧ-инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные излучением или химиотерапией, фиброз желчных путей, фиброз или цирроз печени вследствие любого хронического холестатического заболевания, фиброз кишечника любой этиологии, фиброз, вызванный болезнью Крона, фиброз, вызванный язвенным колитом, фиброз кишечника (например, 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, например, ХОБЛ, астмы, эмфиземы, "легких курильщика", туберкулеза, пневмофиброз, идиопатический легочный фиброз (ИЛФ), фиброз сердца, фиброз почки, нефрогенный системный фиброз, фиброз мышцы, фиброз мягкой ткани (например, средостения или брюшинного пространства), фиброз костного мозга, артрофиброз, фиброз сухожилия, фиброз хряща, фиброз поджелудочной железы, фиброз матки, фиброз нервной системы, фиброз яичка, фиброз яичника, фиброз надпочечника, фиброз артерии, фиброз вены, фиброз глаза, эндомикардиальный фиброз, средостенный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессирующий фиброз (осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, фиброз околоимплантационной области и асбестовый пневмокониоз, артрофиброз, адгезивный капсулит.

Предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), заболеваний печени, вызванных лекарственным средством, заболеваний печени, вызванных алкоголем, заболеваний печени, вызванных возбудителем инфекции, воспалительных заболеваний печени, заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, например, первичного склерозирующего холангита (ПСХ), первичного билиарного холангита (ПБХ), билиарной атрезии, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 3-го типа (ПСВХ3), воспалительных заболеваний кишки, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, колоректального рака, фиброза или цирроза печени, вызванных метаболическими заболеваниями, фиброза или цирроза печени, вызванных НАЖБП, фиброза или цирроза печени, вызванных НАСГ, фиброза или цирроза печени, вызванных алкоголем, фиброза или цирроза печени, вызванных лекарственным средством, фиброза или цирроза печени, вызванных возбудителем инфекции, фиброза или цирроза печени, вызванных паразитарной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных бактериальной инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных вирусной инфекцией, фиброз или цирроз печени, вызванные HBV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных HCV-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных двойной HCV- и ВИЧ-инфекцией, фиброза или цирроза печени, вызванных излучением или химиотерапией, фиброза

желчных путей, фиброза или цирроза печени вследствие любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, фиброза, вызванного болезнью Крона, фиброза, вызванного язвенным колитом, фиброза кишечного тракта (например, тонкой кишки), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легких, фиброза легких вследствие хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, например, ХОБЛ, астмы, эмфиземы, "легких курильщика", туберкулеза, пневмофиброза, идиопатического легочного фиброза (ИЛФ).

Термин "терапия" или "лечение" относится к излечению или профилактике расстройства у субъекта, нуждающегося в этом. Лечение включает введение имеющему заявленное расстройство субъекту соединения, в частности, содержащегося в фармацевтической композиции, т.е. пациенту, чтобы вылечить, задержать, купировать или замедлить развитие расстройства, улучшая тем самым состояние субъекта. Лечение также может быть назначено пациенту, который является здоровым или подвержен риску развития холестатического или фиброзного расстройства, чтобы предотвратить или задержать расстройство.

Следовательно, согласно изобретению лечение иммунного, воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания включает введение комбинации по настоящему изобретению, например, в форме фармацевтической композиции, содержащей компоненты (i) и (ii) комбинации, субъекту, у которого объявлено расстройство, для лечения, задержки, купирования или замедления прогрессирования расстройства, таким образом улучшая состояние пациента или здорового субъекта, в частности субъекта, который подвержен риску развития такого заболевания.

Лечение включает введение комбинации по изобретению пациенту, имеющего симптомы болезни, чтобы вылечить, задержать или замедлить прогресс, таким образом улучшая состояние пациента или здорового субъекта, в частности субъекта, который подвергается риску развития воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

Субъект, подлежащий лечению, является млекопитающим, предпочтительно человеком. Субъект, подлежащий лечению согласно изобретению, может быть выбран на основе нескольких критериев, связанных с фиброзными заболеваниями, например, предшествующих лекарственных терапий, связанных патологий, генотипа, воздействия факторов риска, вирусной инфекции, а также на основании обнаружения любого соответствующего биомаркера, который можно оценить с помощью методов визуализации и иммунологического, биохимического, ферментативного, химического методов или методов обнаружения нуклеиновых кислот.

Субъекты, подлежащие лечению согласно изобретению, могут быть выбраны на основе нескольких критериев, связанных с воспалительными, метаболическими, фиброзными и холестатическими заболеваниями, например предшествующих лекарственных терапий, связанных патологий, генотипа, воздействия факторов риска, вирусной инфекции, а также любого другого соответствующего биомаркера, который можно оценить с помощью методов визуализации и иммунологического, биохимического, ферментативного, химического метода или метода обнаружения нуклеиновых кислот.

В конкретном варианте осуществления лечение воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания может включать введение композиции, содержащей по меньшей мере два соединения по формуле (I). В этом варианте осуществления вводимый компонент (ii) предоставляется в той же композиции, что и по меньшей мере два соединения по формуле (I), или в отдельной форме, например, в другой композиции.

В другом варианте осуществления комбинация по изобретению предназначена для одновременного, последовательного или раздельного введения в терапии, поэтому может быть включена в различные композиции. В случае последовательного введения соединение по формуле (I), в частности ELA, может быть введен до компонента (ii), или компонент (ii) вводится до соединения по формуле (I).

Соединение по формуле (I) может быть составлено в виде фармацевтически приемлемых солей, в частности солей кислот или оснований, совместимых с фармацевтическим применением. Соли соединений по формуле (I) включают фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты, фармацевтически приемлемые соли присоединения основания, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированные соли аммония. Данные соли могут быть получены во время конечной стадии очистки соединения или путем включения соли в предварительно очищенное соединение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или несколько наполнителей или носителей, приемлемых в фармацевтическом контексте (например, солевые растворы, физиологические растворы, изотонические растворы и т.д., совместимые с фармацевтическим применением и хорошо известные специалистам в данной области техники).

Эти композиции могут также содержать один или несколько агентов или носителей, выбранных среди диспергирующих агентов, солюбилизаторов, стабилизаторов, консервантов и т.д. Агенты или носители, пригодные для данных композиций (жидких и/или инъекционных и/или твердых), представляют собой, в частности, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полисорбат 80, маннит, желатин, лактозу, растительные масла, аравийскую камедь, липосомы и т.д.

Данные композиции могут быть составлены в форме инъекционных суспензий, гелей, масел, мазей, пилюль, таблеток, суппозитория, порошков, желатиновых капсул, капсул, аэрозолей и т. д., в некоторых случаях с использованием галеновых форм или устройств, обеспечивающих пролонгированное и/или

медленное высвобождение. Для этого типа композиции предпочтительно могут быть использованы такие агенты, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие соединение по формуле (I) и один или несколько компонентов (ii), могут быть введены различными способами и в разных формах. Например, соединение (соединения) может быть введено системным путем, per os, парентерально, ингаляцией, с помощью назального спрея, закапыванием в нос или инъекцией, такой как, например, внутривенно, путем внутримышечного введения, путем подкожного введения, путем внутрикожного введения, путем наружного применения, путем внутриартериального введения и т.д.

Конечно, способ введения будет адаптирован к форме вводимых соединений в соответствии с процедурами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Компоненты (i) и (ii) комбинированного лекарственного препарата по изобретению вводят в терапевтически эффективных количествах. В контексте настоящего изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, достаточному для получения желаемого терапевтического результата.

Частота и/или доза введения может быть адаптирована специалистом в данной области техники в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, комбинация (например, в форме фармацевтической композиции или набора из частей) по настоящему изобретению может быть введена для лечения фиброзного заболевания для компонента (i) или компонента (ii) в дозе, составляющей от 0,01 до 4000 мг/сутки, например, от 50 до 2000 мг/сутки и, в частности, от 100 до 1000 мг/сутки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения ELA используется в комбинации с компонентом (ii) в дозе, составляющей для элафибранора от 80 до 120 мг/сутки.

В другом предпочтительном варианте осуществления действующие вещества вводят в виде одной или нескольких фармацевтических композиций в форме пилюли или таблетки, предназначенных для перорального приема.

Введение может осуществляться один раз в сутки или даже несколько раз, если это необходимо.

Далее изобретение описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Описание фигур

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

α -SMA - α -актин гладких мышц,
 AP-1 - активирующий белок-1,
 ASBTi - ингибитор апикального натрий-зависимого переносчика желчных кислот,
 ASK1 - регулирующие апоптотические сигналы киназа 1,
 AT1 - рецепторы ангиотензина II 1-го типа,
 CLA, КЛК - конъюгированная линолевая кислота,
 COPD, ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь легких,
 CTGF - фактор роста соединительной ткани,
 SVC - ценикривирок,
 DGAT, ДГАТ - диацилглицерин О-ацилтрансфераза,
 DMSO, ДМСО - диметилсульфоксид,
 DPP4, ДПП4 - дипептидилпептидаза 4,
 ELISA, ИФА - иммуноферментный анализ,
 EOB - разность по Блиссу,
 EOBHSA - наиболее эффективный отдельный агент по Блиссу,
 FABAC - конъюгат жирных и желчных кислот,
 FBS, ФБС - фетальная бычья сыворотка,
 FGF - фактор роста фибробластов,
 FXR - фарнезоидный X-рецептор,
 GDF - фактор роста и дифференцировки,
 GLP-1, ГПП-1 - глюкагоноподобный пептид-1,
 GPCR - рецептор, сопряженный с G-белком,
 HBV - вирус гепатита В,
 HCV - вирус гепатита С,
 15-НЕРЕ - 5-гидроксиэйкозапентаеновая кислота,
 HIV, ВИЧ - вирус иммунодефицита человека,
 HSC, ЗКП - звездчатая клетка печени,
 IC₅₀ - концентрация полумаксимального ингибирования,
 iNOS - индуцируемая синтаза оксида азота,
 IPF, ИЛФ - идиопатический легочный фиброз,
 LO - липоксигеназа,
 ЛПС - липополисахарид,
 LT - лейкотриены,
 MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа,

MMP-9, ММП-9 - матриксная металлопротеиназа 9,
 MMPase, ММП - матриксная металлопротеиназа,
 NADPH, НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат,
 НАЖБП - неалкогольная жировая болезнь печени,
 NAFLD, НАСГ - неалкогольный стеатогепатит,
 NF-κB - ядерный фактор каппа-В,
 NOX NADPH - NOX, НАДФН-оксидаза,
 NSAIDs, НПВП - нестероидные противовоспалительные препараты,
 PAR - рецептор, активируемый протеазами,
 PBC, ПБХ - первичный билиарный холангит,
 PBS, ФСБ - фосфатно-солевой буферный раствор,
 PDE, ФДЭ - фосфодиэстераза,
 PDGF - фактор роста тромбоцитов,
 PFIC3, ПСВХ3 - прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаза 3-го типа,
 PFOR - пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза,
 PPAR - рецептор, активируемый пролифератором пероксисом,
 PPRE - PPAR-отвечающий элемент,
 PSC, ПСХ - первичный склерозирующий холангит,
 ROCK - Rho-ассоциированная протеинкиназа 2,
 RTK - рецептор тирозинкиназы,
 SGLT - натрий-глюкозный транспортер,
 STAT - переносчики сигнала и активаторы транскрипции,
 TGFβ - трансформирующий фактор роста β,
 TGFβRI - рецепторы TGFβ I типа,
 TGFβRII - рецепторы TGFβ II типа,
 THBS1 - тромбоспондин 1,
 THR β - β-рецептор тиреоидного гормона,
 TIMP - тканевый ингибитор металлопротеиназ 1,
 TLR-4 - толл-подобный рецептор 4,
 VAP-1 - белок сосудистой адгезии-1,
 VDR - рецептор витамина D.

Фиг. 1: Эффект комбинации 1 мг/кг/сутки ELA и 10 мг/кг/сутки ОХК на показатель поверхности фиброза.

Фиг. 2: Эффект комбинации 3 мг/кг/сутки ELA и 10 мг/кг/сутки ОХК на показатель поверхности фиброза.

Фиг. 3: Эффект комбинации 1 мг/кг/сутки ELA и 10 мг/кг/сутки ОХК на печеночный коллаген.

Фиг. 4: Эффект комбинации 3 мг/кг/сутки ELA и 10 мг/кг/сутки ОХК на печеночный коллаген.

Фиг. 5: эффект комбинации 3 мг/кг/сутки ELA и 10 мг/кг/сутки ОХК на маркеры фиброза.

Фиг. 6: Различное противοфиброзное действие элафибранора в сравнении с ценикривироком и безафибратом, в ЗКП человека, индуцированных TGFβ.

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

После 48 ч инкубирования с помощью ИФА измеряли экспрессию α-SMA.

Полученные значения преобразовывали в процентное ингибирование по сравнению с контролем TGFβ1. Данные представлены как среднее значение (трехкратной повторности) ± стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с использованием одностороннего ANOVA с последующими ретроспективными анализами с поправкой Бонферрони, используя программное обеспечение "Sigma Plot 11.0" [*: p<0,05; *: p<0,01; *: p<0,001 (сравнение с группой TGFβ1 1 нг/мл)]. Подбор кривой и расчет концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) проводили с помощью программного обеспечения "XLfit 5.3.1.3".

Фиг. 7: Комбинация элафибранора с ценикривироком синергически ингибирует α-SMA в ЗКП человека, индуцированных TGFβ1.

Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивности разности по Blissу.

Были подготовлены серии разведений элафибранора (горизонтальный ряд) и ценикривирока (вертикальный ряд), включая их соответствующие контроли ДМСО.

Полученные смеси добавляли в лишенные сыворотки ЗКП 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 как среднее значение четырехкратной повторности.

(В) Баллы по Блисссу рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений со значениями по Блисссу >10 считалась синергической (окрашена от светло-серого до черного). Также был рассчитан общий балл по Блисссу, включающий все комбинации.

(С) Значения полученных данных пары синергических комбинаций построены в виде гистограммы. Данные представлены как среднее значение (четырёхкратной повторности) \pm стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего анализа ANOVA с последующими ретроспективными анализами с поправкой Бонферрони, используя программное обеспечение "Sigma Plot 11.0" [*: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ (сравнение с группой "комбинированный лекарственный препарат")].

Фиг. 8: Безафибрат не синергирует с ценикривироком для уменьшения фиброза в ЗКП человека, индуцированных TGF β 1

Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивизма разности по Блисссу.

Были подготовлены серии разведений элафибранора (горизонтальный ряд) и безафибрата (вертикальный ряд), включая их соответствующие контроли ДМСО. Полученные смеси добавляли в лишенные сыворотки ЗКП за 1 ч до активации профиброгенным цитокином TGF β 1 (1 нг/мл).

(А) Процентное ингибирование α -SMA по сравнению с контролем TGF β 1.

(В) Баллы разности по Блисссу рассчитывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Любая пара соединений со значениями по Блисссу >10 считалась синергической (окрашена от светло-серого до черного). Также был рассчитан общий балл по Блисссу, включающий все комбинации.

Фиг. 9: Комбинации элафибранора с MSDC-0602, PXS-4728A, апарареноном, CF-102, висмодегибом, PBI-4050, KD-025, DUR-928, VK-2809 и эмриказаном синергически ингибируют α -SMA в ЗКП человека, индуцированных TGF β 1.

Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивизма разности по Блисссу. Проценты ингибирования α -SMA по сравнению с контролем TGF β 1 построены в виде гистограммы для репрезентативных синергических комбинаций. Данные представлены как среднее значение (четырёхкратной повторности) \pm стандартное отклонение (SD). *: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ с использованием одностороннего анализа ANOVA и ретроспективного анализа с критерием наименьшей значимой разности (LSD) Фишера. MSDC=MSDC-0602.

Фиг. 10: Комбинации элафибранора с CP-640186, GS-0976 или ЖКВ-121 (налмефена) синергически ингибируют секрецию коллагена в микротканях печени

Микроткани обрабатывали с помощью метаболической индукции стимулом НАСГ только с одним элафибранором или без него (белая полоса), только с одним соединением (ii) (черная полоса) или их комбинацией (серая полоса). Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивизма разности по Блисссу. Проценты ингибирования НАСГ по сравнению с контролем стимула построены в виде гистограммы для репрезентативных синергических комбинаций. Данные представлены как среднее значение (трехкратной повторности) \pm стандартное отклонение (SD). *: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ с использованием одностороннего анализа ANOVA и ретроспективного анализа с критерием наименьшей значимой разности (LSD) Фишера.

Фиг. 11: Комбинация элафибранора с гемкабеном синергически ингибирует секрецию ФНО α в макрофагах, активированных ЛПС.

Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивизма разности по Блисссу. Проценты ингибирования ФНО α по сравнению с контролем ЛПС построены в виде гистограммы для репрезентативных синергических комбинаций. Данные представлены как среднее значение (четырёхкратной повторности) \pm стандартное отклонение (SD). *: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ с использованием одностороннего анализа ANOVA и ретроспективного анализа с критерием наименьшей значимой разности (LSD) Фишера.

Фиг. 12: Комбинации элафибранора с CP640186, VK-2809, апараренона (Ara) или арамола (Aram) синергически ингибируют накопление жира в HepG2.

Комбинации тестировались в матричной форме исследования зависимости доза-эффект и анализировались в соответствии с моделью аддитивизма разности по Блисссу. Проценты ингибирования накопления жира по сравнению с контролем, обработанным СЖК, построены в виде гистограммы для репрезентативных синергических комбинаций. Данные представлены как среднее значение (четырёхкратной повторности) \pm стандартное отклонение (SD). *: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$ с использованием одностороннего анализа ANOVA и ретроспективного анализа с критерием наименьшей значимой разности (LSD) Фишера.

Фиг. 13: Комбинация элафибранора с MGL-3196 синергически ингибирует накопление жира в 3D культуре сфероидов Huh7.

Сфероиды обрабатывали с помощью метаболического стимула НАСГ только с одним элафибрано-

ром или без него (белая полоса), только с MGL3196 (серая полоса) или их комбинацией (черная полоса). Измерение накопления липидов проводили, как описано в материалах и методах. Стандартные отклонения показаны в виде "усов" (n=3). Расчетное значение по Блисссу указано в верхнем левом углу. Значимые различия (*p<0,05; * p<0,01; *p<0,001) после однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и анализа с критерием наименьшей значимой разности (LSD) Фишера.

Фиг. 14: Элафибранор (GFT505, 3 мг/кг/сутки) и селонсертиб (SEL, 30 мг/кг/сут) синергически снижают фиброз, ремоделирование ткани и маркеры воспаления у мышей с НАСГ (мышей, получавших диету CDFF).

(А) Процент поверхности фиброза оценивали путем морфометрического количественного определения положительно окрашенной пикросириусом области относительно площади среза печени.

(В) Содержание печеночного коллагена.

(С) Плазменная концентрация PIIINP, суррогатные маркеры фиброза печени.

(D) Плазменная концентрация TIMP1, суррогатные маркеры фиброза печени,

Экспрессию Col1 α 1 (E), MMP2 (F), TGF β 1 (G) в качестве маркеров фиброза и ремоделирования ткани, а также ФНО α (H) и ССК2 (I), маркеров воспаления, оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение, \square p<0,05, $\square\square$ p<0,01, $\square\square\square$ p<0,001 с использованием одностороннего критерия Стьюдента с поправкой Уэлча. HSA, модель наиболее эффективного отдельного агента.

Фиг. 15: Элафибранор (GFT505, 1 или 3 мг/кг/сутки) и GKT-831 (GKT, 60 мг/кг/сутки) синергически снижают НАСГ и фиброз у мышей с НАСГ (мышей, получавших диету CDFF).

(А) Процент поверхности фиброза оценивали путем морфометрического количественного определения положительно окрашенной пикросириусом области относительно площади среза печени.

(В) Гистологическая оценка очагов воспаления в 10 полях зрения микроскопа (20 \times).

(С) Балл по шкале оценки активности НАЖБП, рассчитанный путем расчета суммы степеней выраженности стеатоза, баллонной дистрофии и лобулярного воспаления (минимум 0 - максимум 8) по данным "Сети клинических исследований НАСГ" (Kleiner 2005, Brunt 1999).

Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение, \square p<0,05, $\square\square$ p<0,01, $\square\square\square$ p<0,001 использованием одностороннего критерия Стьюдента с поправкой Уэлча. \$ p<0,05, \$\$ p<0,01, \$\$\$ p<0,001 с использованием одностороннего U-критерия Манна-Уитни (непараметрического). HSA, модель наиболее эффективного отдельного агента

Фиг. 16: Элафибранор (GFT505, 1 мг/кг/сутки) и GS-0976 (GS, 30 мг/кг/сут) синергически снижают стеатоз и массу тела у мышей с НАСГ (мышей, получавших диету CDFF).

(А) Степень стеатоза, оцениваемая путем гистологического исследования в соответствии с рекомендациями "NASH Clinical Research Network".

(В) Содержание печеночных триглицеридов.

(С) Потеря массы тела после 8 недель лечения по сравнению с контролем. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение, \square p<0,05, $\square\square$ p<0,01, $\square\square\square$ p<0,001 с использованием одностороннего критерия Стьюдента с поправкой Уэлча. HSA, модель наиболее эффективного отдельного агента

Примеры

Пример 1. План исследования комбинированной терапии.

Материалы и методы.

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO, Fluka, кат. № 41640).

1. Пример в модели ЗКП человека, индуцированных TGF β 1.

Культура ЗКП человека.

Первичные звездчатые клетки печени человека (ЗКП) (Innopro) культивировали в среде "STeCM" (ScienCell, кат. № 5301), дополненной 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, ScienCell, кат. № 0010), 1% пенициллина/стрептомицина (ScienCell, кат. № 0503) и добавкой для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, кат. № 5352). Для улучшения адгезии флаконы для культивирования клеток покрывали поли-L-лизин (Sigma, кат. № P4707).

Подготовка композиций.

Двухкомпонентная матрица комбинаций.

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные ELA и компонент (ii) серийно разводили в DMCO в серии из 5 точек в горизонтальном ряду (ELA) и в серии из 11 точек в вертикальном ряду (компонент (ii)) 96-луночного планшета. Впоследствии матрица комбинаций 5X11 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1. Опытные концентрации для каждого соединения были выбраны на основе соответствующей IC₅₀ каждого соединения в качестве отдельного агента, полученной путем измерения содержания α -SMA в модели ЗКП, стимулированных с помощью TGF β 1.

Активация ЗКП человека TGF β 1 и обработка соединением.

Первичные звездчатые клетки печени человека (ЗКП) (Innopro) культивировали в стандартных ус-

ловиях, как описано выше. Затем клетки высевали при плотности 2×10^4 клеток/лунку в 96-луночные планшеты для измерения α -SMA с помощью ИФА. На следующий день культуральную среду удаляли и клетки промывали ФСБ (Invitrogen, кат. № 14190). ЗКП человека культивировали в течение 24 ч в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработки ELA компонентом (ii) и соответствующими комбинациями ELA/компонент (ii) лишенные сыворотки ЗКП человека предварительно инкубировали в течение 1 ч с соединениями с последующим добавлением профиброгенных стимулов TGF- β 1 (PeproTech, кат. № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде в течение дополнительных 48 ч.

ИФА α -SMA.

Уровень α -SMA измеряли с помощью "сэндвич"-варианта ИФА. Говоря кратко, лунки планшета для ИФА сначала покрывали иммобилизованным антителом (мышинное моноклональное анти-АСТА2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в ФСБ + 2% Твин-20 в течение 1 ч 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 на 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки, добавляли идентифицирующее антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-АСТА2 антитело, Abnova) на 2 ч при комнатной температуре с последующими тремя промывками. Для обнаружения сначала в течение 30 мин при комнатной температуре применяли стрептавидин, конъюгированный с HRP (R&D Systems, кат. № DY998). После промывки добавляли субстрат ТМБ HRB (BD, кат. № 555214) и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. После окисления ТМБ образует водорастворимый синий продукт реакции, который с добавлением серной кислоты становится желтым (останавливающий раствор), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм, используя спектрофотометр. Полученный цвет прямо пропорционален количеству α -SMA, присутствующего в лизате.

2. Пример в модели активации ЗКП в 3D микроткани печени человека.

3D культура микроткани печени человека.

Криоконсервированные первичные гепатоциты человека (IPHN 11) и криоконсервированные первичные непаренхимные клетки человека (NPCs, IPHN 11) поставлялись фирмой "BioreclamationIVT". Криоконсервированные первичные звездчатые клетки печени человека (ЗКП) поставлялись фирмой "Inporot". Образцы 3D микротканей печени человека "InSight™" (MT-02-302-95; InSphero AG) получали, используя IPHN 11, IPHN 11 и ЗКП человека, в 96-луночной культуральной платформе с висячими каплями (Gravity PLUSTM). После формирования микротканей их переносили в специальную 96-луночную платформу для культивирования и анализа микроткани (Gravity TRAPTM). Дальнейшие манипуляции и обработка соединениями проводились в планшетах "Gravity TRAPTM". После формирования трехмерные микроткани культивировали в среде "3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium-INF" (hLiMM CS-07-001b-01; InSphero AG) при 37°C, 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе для культур клеток в течение 4 суток. Половину питательной среды обновляли каждые 2 суток.

Подготовка композиций: Двухкомпонентная матрица комбинаций.

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные ELA и компонент (ii) серийно разводили в ДМСО в серии из двух точек в горизонтальном ряду (ELA) и в серии из трех точек в вертикальном ряду (компонент (ii)) 96-луночного планшета. Впоследствии матрица комбинаций 2X3 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1.

Метаболическая стимуляция 3D микроткани печени человека "InSight™" и обработка соединениями.

3D микроткань печени человека "InSight™" (InSphero) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем микроткани культивировали в течение 24 ч в бессывороточной среде. Для лечения ELA компонентом (ii) и соответствующими комбинациями ELA/компонент (ii) лишенные сыворотки микроткани обрабатывали как с помощью метаболической индукции стимулом НАСГ, так и соединениями (день 0) с последующим возобновлением метаболической индукции стимулом НАСГ на день 3 в течение дополнительных 3 дней. Супернатанты для измерения Coll α 1 собирали на 6-й день.

ИФА Coll α 1.

Уровень Coll α 1 измеряли с помощью "сэндвич"-варианта ИФА. Говоря кратко, лунки планшета для ИФА сначала покрывали иммобилизованным антителом (иммобилизованным мышинным антителом к проколлагену I α 1 человека, "Elisa Pro-Collagen I α 1/COLIA1", DuoSet ELISA, R&D, кат. № DY6220-05) при комнатной температуре в течение ночи. После трех промывок в ФСБ + 0,5% Твин-20 в течение 1 ч добавляли блокирующий раствор, состоящий из ФСБ + 0,1% БСА, после чего следовал еще один цикл промывки. Культуральные супернатанты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом на 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки, добавляли идентифицирующее антитело (детектируемое биотинилированное овечье антитело к проколлагену I α 1 человека) на 2 ч при комнатной температуре с последующими тремя промывками. Для обнаружения сначала в течение 20 мин при комнатной температуре применяли стрептавидин, конъюгированный с HRP. После промывки добавляли субстрат ТМБ HRB (BD, кат. № 555214) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной темпера-

туре в темноте. После окисления ТМБ образует водорастворимый синий продукт реакции, который с добавлением серной кислоты становится желтым (останавливающий раствор), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм, используя спектрофотометр. Полученный цвет прямо пропорционален количеству $\text{col1}\alpha 1$, присутствующего в супернатанте.

3. Пример в макрофагах, активированных ЛПС.

Дифференцировка моноцитов ТНР-1 в макрофаги.

Моноциты ТНР-1 (ЕСАСС, кат. № 88081201) высевали при плотности 25550 клеток/лунку в 384-луночный планшет со средой RPMI1640 (Gibco, 21875), дополненной 10% СВФ, и дифференцировали в макрофаги с использованием ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат, Sigma, P8139) в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 24 ч.

Подготовка композиций: Двухкомпонентная матрица комбинаций.

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные ЕЛА и компонент серийно разводили в ДМСО в серии из 6 точек в вертикальном ряде (ЕЛА) и в серии из 10 точек в горизонтальном ряде (компонент) 96-луночного планшета для других соединений. Впоследствии матрица комбинаций 6X10 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1.

Обработки соединением и стимуляция ЛПС.

После 24 ч среду с ФМА удаляли и заменяли на бессывороточную среду RPMI. Для обработок ЕЛА компонентом и соответствующими комбинациями ЕЛА/компонент лишенные сыворотки макрофаги ТНР-1 предварительно инкубировали в течение 24 ч с соединениями с последующим добавлением липополисахарида ЛПС (100 нг/мл, E.coli 055 B5, Sigma, L6529) в течение дополнительных 6 ч.

Количественное определение ФНО α человека.

ФНО α человека в супернатанте определяли количественно с использованием технологии гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Cisbio 62HTNFAPEG), основанной на технологии FRET. Метод FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) основан на переносе энергии между двумя флуорофорами, донором и акцептором, когда они находятся в непосредственной близости. Молекулярные взаимодействия между биомолекулами можно оценить, связав каждого партнера с флуоресцентной меткой и определив уровень переноса энергии (665 нм). Клеточный супернатант, образец или стандарт помещали непосредственно в аналитический планшет для обнаружения с помощью реактивов "HTRF®". Антитела, меченные донором и акцептором HTRF, предварительно смешивали и добавляли в одну стадию дозирования. Интенсивность сигнала пропорциональна количеству образованного комплекса антиген-антитело и, следовательно, концентрации ФНО α . Путем подбора данных с четырехпараметрической логистической моделью получали калибровочную кривую из семи точек (от 39 пг/мл до 2500 пг/мл с введенным человеческим ФНО α).

4. Пример в гепатоцитах, нагруженных жиром (НерG2).

Клеточная культура НерG2.

Клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека культивировали в среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы (Gibco, кат. № 31053, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Gibco, кат. № 10270), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, кат. № 15140), 1% MEM НЗАК (Gibco, кат. № 11140), 1% L-глутамин (Gibco, кат. № 25030) и 1% пирувата натрия (Gibco, кат. № 11360).

Подготовка композиций: Двухкомпонентная матрица комбинаций

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные ЕЛА и компонент серийно разводили в ДМСО в серии из 5 точек в горизонтальном ряде (ЕЛА) и в серии из 11 точек в вертикальном ряде (компонент) 384-луночного планшета. Впоследствии матрица комбинаций 5X11 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1.

Подготовка свободной жирной кислоты (СЖК).

Олеиновая (кат. № O1383) и пальмитиновая (P0500) кислоты были приобретены в фирме "Sigma". Исходные растворы FFA (100 мМ) готовили в 0,1 М NaOH при 80°C. Рабочие растворы 4,5 мМ пальмитата/10% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 9 мМ олеата/10% БСА готовили путем комплексования соответствующего объема исходного раствора с 10% БСА (с низким содержанием эндотоксина без FFA; Sigma-Aldrich, Борнем, Бельгия) на водяной бане при 55°C (15 мин).

Нагрузка жиром и обработка соединением.

Для оценки содержания липидных капель НерG2 высевали при плотности 40000 клеток/лунку в 384-луночные планшеты. На следующий день культуральную среду удаляли и клетки промывали ФСБ (Invitrogen, кат. № 14190). НерG2 культивировали в течение 24 ч в бессывороточной среде. Для обработки ЕЛА компонентом и соответствующими комбинациями ЕЛА/компонент лишенные сыворотки НерG2 предварительно инкубировали в течение 24 ч с соединениями с последующим добавлением смеси олеиновая кислота:пальмитиновая кислота (2:1) в конечной концентрации 0,5 мМ в течение дополнительных 24 ч.

Измерение внутриклеточных липидных капель.

Для измерения внутриклеточного содержания липидных капель клетки доводили до комнатной температуры и промывали 40 мкл ФСБ. Клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной темпера-

туре с 40 мкл разбавленного реактива "Adipored" (2,5 мкл реактива "Adipored" в 200 мкл ФСБ) (Lonza, Walkersville, MD). Относительную флуоресценцию измеряли (к возбуждения при 485 нм, к излучения при 580 нм) с использованием флуоресцентного спектрометра (Spark Tecan, кат. № 30086376, SN № 1801002745). Анализы проводили в четырех повторах.

5. Пример в 3D культуре сфероидов Huh7.

3D культура сфероидов Huh7.

Криоконсервированные Huh7 были приобретены в ECACC. Клетки выращивали в планшетах с необработанной поверхностью (Costar), среде Уильяма (Sigma), содержащей 10% ФБС (Gibco) при 37°C, 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе для культур клеток. Клетки агрегировали и формировали сфериды в течение 5 суток.

Подготовка композиций: Двухкомпонентная матрица комбинаций.

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные ELA и компонент (ii) серийно разводили в ДМСО в серии из двух точек в горизонтальном ряду (ELA) и в серии из трех точек в вертикальном ряду (компонент (ii)) 96-луночного планшета. Впоследствии матрица комбинаций 2X3 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1.

Метаболическая стимуляция 3D культуры сфероидов Huh7 и обработка соединениями.

3D сфериды Huh7 культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем их культивировали в течение 24 ч в бессывороточной среде. Для лечения ELA компонентом (ii) и соответствующими комбинациями ELA/компонент (ii) лишенные сыворотки сфериды обрабатывали как с помощью метаболического стимула НАСГ, так и соединениями (день 0) с последующим возобновлением метаболического стимула НАСГ и соединения на день 4 в течение дополнительных 3 дней. Сфериды окрашивали на предмет наличия накопления липидов на 7-й день.

Окрашивание и количественное определение липидов.

Внутриклеточное накопление липидов определяли количественно с использованием реактива для анализа "AdipoRed™ Assay Reagent" (Lonza). Сфериды подвергали количественному флуоресцентному анализу при λ_{exc} : 485 нм и λ_{em} : 572 нм, используя спектрофотометр для чтения планшетов (TECAN).

Результаты и обсуждение.

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов характерна для многих фиброзных заболеваний. После повреждения печени покоящиеся ЗКП подвергаются процессу активации, который характеризуется дифференцировкой в (α -SMA)-положительные миофибробласты. Агонист PPAR элафибранор обладает антифибротической активностью в ЗКП человека, активированных профиброгенным цитокином TGF β 1 (фиг. 9). Здесь показано, что комбинации MSDC-0602, PXS-4728, апараренона, CF-102 (намоденосонона), висмодегиба, PBI-4050, эмрикасана, DUR-928, VK-2809 или KD-025 с элафибранором неожиданно синергически ингибируют секрецию α -SMA ЗКП (фиг. 9).

Поскольку печень состоит из клеток разных типов (гепатоциты, иммунные клетки, ЗКП, ...) и поскольку активация ЗКП может быть результатом различных стимулов, вовлекающих другие клетки печени, для тестирования комбинированного лечения фиброза также использовалась модель микротканей печени. Обработка метаболическим стимулом НАСГ увеличивала секрецию коллагена микротканью. В этой модели элафибранор синергировал с CP-640186, GS-0976 и налмефеном для ингибирования секреции коллагена (фиг. 10).

В совокупности эти результаты демонстрируют синергические антифибротические эффекты комбинаций элафибранора с MSDC-0602, PXS-4728, апарареноном, CF-102 (намоденозоном), висмодегибом, PBI-4050, эмрикасаном, DUR-928, VK-2809, KD-025, CP-640186, GS-0976 или налмефеном (JKB-121).

Метаболические заболевания, например НАЖБП/НАСГ, связаны с неспецифическим воспалением. Активация иммунных клеток продуцирует цитокины, которые изменяют метаболические функции печени и периферических органов (жировой ткани, поджелудочной железы, ...). Проницаемость стенки кишечника, описанная при метаболических и печеночных заболеваниях, приводит к увеличению циркулирующих бактериальных компонентов (липополисахаридов или ЛПС), которые активируют макрофаги в печени и периферических органах (жировой ткани). Поскольку PPAR обладают противовоспалительной активностью, авторы изобретения исследовали, может ли элафибранор и другие соединения ингибировать активацию макрофагов с помощью ЛПС. В модели моноцитов THP1, дифференцированных в макрофаги, обработка ЛПС активирует макрофаги, что измеряется секрецией ФНО α . Только элафибранор (1 мкм) ингибировал ФНО α на 21% (фиг. 11). Комбинация элафибранора с гемкабеном неожиданно эффективно ингибировала секрецию ФНО α на 50% (фиг. 11). Следовательно, этот результат показывает способность элафибранора к синергизму с другими соединениями для снижения уровня воспаления, наблюдаемого при ряде заболеваний, включая НАСГ и метаболические заболевания.

НАЖБП/НАСГ характеризуется первичным накоплением жира в гепатоцитах (стеатозом), который вызывает липотоксичность, приводя к воспалению, гибели клеток, ремоделированию ткани и, в конечном итоге, к фиброзу. Поскольку известно, что PPAR α и PPAR δ индуцируют окисление жира и ингибируют липогенез de novo, мы хотели посмотреть, может ли элафибранор в комбинации с другими соединениями предотвращать накопление жира в гепатоцитах. Таким образом, клетки HepG2 обрабатывали

свободной жирной кислотой (СЖК), чтобы вызвать накопление липидных капель. В этой модели отдельно взятый элафибранор (10 мкМ) уменьшал накопление жира на 20%. Снижение неожиданно достигло 40%, когда элафибранор был объединен с CP-640186, VK-2809, апарареноном или арамхолом (фиг. 12).

Также для решения этого вопроса использовалась трехмерная (3D) модель гепатоцитов *in vitro*, позволяющая более физиологично воспроизводить структуру печени. В этой модели накопление жира было получено путем обработки метаболическим стимулом НАСГ. Элафибранор (3 мкМ) снизил содержание жира на 12% (фиг. 13). Комбинация элафибранора с MGL-3196 (1 мкМ) эффективно снижала содержание липидов в гепатоцитах на 28% (фиг. 13), демонстрируя синергический эффект при совместном применении обоих препаратов.

В совокупности эти результаты показывают, что элафибранор синергирует с CP-640186, VK-2809, апарареноном, арамхолом и MGL-3196, в частности, для уменьшения стеатоза.

В заключение эти результаты показывают способность элафибранора взаимодействовать с MSDC-0602, PXS-4728, апарареноном, CF-102 (намоденозоном), висмодегибом, PBI-4050, эмрикасаном, DUR-928, KD-025, CP-640186, GS-0976, налмефеном (ЖКВ-121), VK-2809, MGL-3196 и арамхол, в частности, для снижения уровня НАЖБП.

Пример 2. Комбинация ELA и ОХК.

Материалы и методы.

Оценка элафибранора, ОХК и комбинации элафибранор + ОХК на хронической модели CDAA + 1% холестерина (12 недель).

Профилактические эффекты отдельно взятых элафибранора, ОХК и их комбинации оценивали в крысиной модели фиброзирующего НАСГ, получавших диету CDAA + 1% холестерин. Самцы крыс линии Вистар весом 150-175 г получали контрольную диету (CSAA), диету CDAA + 1% холестерин или диету CDAA + 1% с добавлением элафибранора в дозе 1, 3 и 10 мг/кг/сутки, ОХК в дозе 10 и 30 мг/кг/сутки или комбинированных лекарственных препаратов (элафибранора в дозе 1, 3 и 10 мг/кг/сутки в комбинации с ОХК в дозе 10 мг/кг/сутки) в течение 12 недель.

Вес тела и потребление пищи контролировали дважды в неделю. В последний день лечения крыс умерщвляли после 6-часового периода голодания. Печень быстро удаляли для биохимического и гистологического исследований.

Все процедуры на животных выполняли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по правильному уходу и использованию лабораторных животных.

Гистология.

Заливка тканей и изготовление срезов.

Части печени сначала фиксировали в течение 12 ч в 4%-ном растворе формалина. Затем кусочки печени промывали 30 мин в ФСБ и обезживали в растворах этанола (последовательные ванны 70-, 80-, 95- и 100%-ного этанола). Куски печени выдерживали в трех различных ваннах ксилола (Sigma-Aldrich, кат. № 534056), а затем в двух ваннах жидкого парафина (56°C). Затем кусочки печени помещали в лотки, которые аккуратно заполняли "Histowax®", чтобы полностью покрыть ткань.

Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, отделяли от лотков и хранили при комнатной температуре. Из блоков печени получали срезы толщиной 3 мкм.

Окрашивание гематоксилином/эозином.

Срезы печени подвергали депарафинированию, регидратировали и выдерживали в течение 3 мин в гематоксилине Майера (Microm, кат. № F/C0303). Затем срезы печени промывали водой и инкубировали в течение 1 мин в эозине G (VWR, кат. № 1.09844.1000). Срезы промывали в воде, затем обезживали и монтировали с использованием среды "CV Mount medium" (Leica, кат. № 14046430011).

Окрашивание пикросирусом красным.

Срезы печени подвергали депарафинированию, регидратировали и перед промывкой в ванне 0,5%-ной уксусной кислоты (Panreac, кат. № 131008.1611) выдерживали в течение 15 мин в 0,1%-ном растворе Fast Green FCF (Sigma-Aldrich, кат. № F7258). Затем срезы печени промывали водой и инкубировали 30 мин в 0,1%-ном растворе сириуса красного (Direct Red 80, Fluka, кат. № 43665) в насыщенной водной пикриновой кислоте (Sigma-Aldrich, кат. № P6744). Затем срезы обезживали и монтировали с использованием среды "CV Mount medium" (Leica, кат. № 14046430011).

Гистологические исследования.

Гистологические исследования проводил специалист, работающий с обезличенными данными по источнику каждого образца печени. Виртуальные слайды были получены с использованием сканера "Pannoramic 250" от фирмы-производителя "3D Histech". Баллы, суммирующие основные гистологические поражения при НАСГ, определялись по данным "Сети клинических исследований НАСГ" (Kleiner 2005, Brunt 1999) для каждого животного. Говоря кратко, оценивали стеатоз, лобулярное воспаление и балонную дистрофию гепатоцитов. Балл по шкале оценки активности НАЖБП (балл по шкале оценки NAS) устанавливался для каждого испытуемого животного как невзвешенная сумма определения степени выраженности стеатоза (0-3), лобулярного воспаления (0-3) и балонной дистрофии (0-2).

Используя программное обеспечение "Quant Center" ("3D Histech", включая модули "Pattern Quant"

и "Histo Quant"), определяли количество участков с окрашенным коллагеном. Говоря кратко, модуль "Pattern Quant" использовали для обнаружения ткани и измерения ее поверхности. Затем использовали модуль "Histo Quant" для определения содержания окрашенного коллагена и измерения его поверхности на основе метода цветового порога. Площадь фиброза затем выражали в процентах от поверхности коллагена ко всей ткани на одно животное.

Измерение содержания печеночного коллагена.

Содержание печеночного коллагена определяли с помощью соответствующего набора "QuickZyme" (Анализ общего коллагена, кат. № QZB-totcol2). Анализ основан на обнаружении гидроксипролина, который является непротеиногенной аминокислотой, найденной, в основном, в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в тканевых гидролизатах можно использовать в качестве прямого показателя количества коллагена, присутствующего в ткани (без различия между проколлагеном, зрелым коллагеном и продуктами распада коллагена).

Перед дозированием гидроксипролина необходим полный гидролиз образцов тканей в 6 М HCl при 95°C. Анализ приводит к образованию хромогена с максимальной поглощающей способностью при 570 нм. Результаты выражены в виде мг коллагена/г печени.

альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2M$).

Плазматическую концентрацию $\alpha 2M$ определяли с помощью набора "Abcam" (кат. № ab157730) в соответствии с инструкциями производителя. Говоря кратко, микропланшет предварительно покрывают антителом, специфичным к крысиному $\alpha 2M$. Затем стандарты, контроли и образцы вносили в лунки пипеткой, и любой $\alpha 2M$, присутствующий в плазме, связывался с иммобилизованным антителом. После промывки в лунки добавляют вторичное антитело, меченное пероксидазой хрена. После промывки в лунки добавляют раствор субстрата. Ферментативную реакцию останавливают добавлением стоп-реagenta. Интенсивность цвета, измеренная при 450 нм, пропорциональна количеству $\alpha 2M$, связанного на начальном этапе. Затем значения выборки выводили из калибровочной кривой. Результаты выражены в нг/мл.

N-Терминальный пропептид проколлагена III (P1INP).

Плазматическую концентрацию P1INP определяли с помощью метода ИФА, используя набор фирмы "Cloud-Clone Corp" (кат. № SEA573Ra), в соответствии с инструкциями производителя. Микротитрационный планшет предварительно покрыт антителом, специфичным к P1INP. Стандарты или образцы добавляют в соответствующие лунки микротитрационного планшета с биотинилированным антителом, специфичным к P1INP. Затем в каждую лунку микропланшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. После добавления раствора субстрата ТМБ только те лунки, которые содержат P1INP, биотинилированное антитело и авидин, конъюгированный с ферментом, будут демонстрировать изменение цвета. Фермент-субстратную реакцию останавливали добавлением раствора серной кислоты и изменение цвета измеряли спектрофотометрически при длине волны 450 ± 10 нм. Концентрацию P1INP в образцах затем определяли путем сравнения OD образцов с калибровочной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Анализ экспрессии генов печени.

Тотальную РНК выделяли из печени крыс с помощью набора "Rneasy Mini Kit" (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Тотальную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV RT (ревертазы вируса мышинного лейкоза Молони) (Invitrogen, кат. № 28025) в 1× буфере RT (Invitrogen), 0,5 мМ DTT (Invitrogen), 0,18 мМ смеси dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Amersham) и 30 ед. ингибитора РНКаз (Promega).

Затем проводили количественную ПЦР с использованием системы обнаружения ПНР-анализатора реального времени "CFX96 Touch™" (BioRad). Говоря кратко, ПЦР проводили в формате 96-луночного планшета в 25 мкл общего объема, содержащего 1 мкл реакции с обратной транскрипцией, 0,5 мкл обратных и прямых праймеров (по 10 пмоль каждый) и 12,5 мкл 2X "iQ SYBR Green Supermix" (BioRad), используя следующие последовательности праймеров:

Ген	Прямой	Обратный
RPLP0	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCT CC (SEQ ID NO:1)	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCA CAG (SEQ ID NO:2)
α SMA (ACTA2)	ACTGGGACGACATGGAAAAG (SEQ ID NO:3)	CATCTCCAGAGTCCAGCACA (SEQ ID NO:4)
TIMP1	TCCCCAGAAATCATCGAGAC (SEQ ID NO:5)	TCAGATTATGCCAGGGAACC (SEQ ID NO:6)
TGFB1	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG (SEQ ID NO:7)	TGGGACTGATCCCATTGATT (SEQ ID NO:8)
ССК5	CAGAACAGTCAACTTTGGGG SEQ ID NO:9	ACGTGGAAAATGAGGACTGC (SEQ ID NO:10)

Уровни экспрессии нормализовали, используя экспрессию гена RPLP0 в качестве референсного гена "домашнего хозяйства" в образцах. Для каждого гена калибровочные кривые строили путем выбора наилучших точек (по меньшей мере трех точек), чтобы иметь эффективность ПЦР, близкую к 100%, и коэффициент корреляции, близкий к 1. Уровни экспрессии определяли, используя уравнение калибровочной кривой как для генов "домашнего хозяйства", так и для целевого гена (принимая во внимание специфическую эффективность ПЦР для каждого целевого гена).

Результаты и обсуждение.

Результаты представлены в следующей таблице и на фиг. 1-5.

	GFT505 3 мг/кг/сут	ОХК 10 мг/кг/сут	GFT505+ОХК
Поверхность фиброза	34±17%*	74±45%	19±4% #
Содержание печеночного коллагена	45±12%*	67±23%*	34±5% #
Уровень мРНК α SMA	66±27%	109±68%	39±18% #
Уровень мРНК TIMP1	78±23%	110±43%	46±13% ##
Уровень мРНК TGF β 1	94±20%	110±23%	67±16% ##
Уровень мРНК ССК5 ⁺	103±51%	81±28%	56±17% #

Процент по сравнению с необработанными диетой CDAA + 1% холестерина крысами.

*p<0,01, *p<0,001 в сравнении с группой "CDAA + 1% холестерина" (ANOVA+Бонферрони).

p<0,05, ## p<0,07 в сравнении с лучшим отдельным агентом (t-критерий Стьюдента).

(+маркер воспаления).

Западный образ жизни неизменно связан с высоким уровнем заболеваемости неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), хроническим заболеванием печени, которое часто прогрессирует до фиброза и цирроза печени, и в конечном итоге может привести к гепатоцеллюлярной карциноме. В настоящее время не существует одобренной терапии НАСГ. Комбинации лекарственных препаратов, направленных одновременно на нескольких терапевтических мишеней, имеют потенциал, чтобы значительно улучшить реакцию на лекарственное средство и оказывать благоприятное действие на более обширную категорию пациентов. Комбинации лекарственных препаратов ранее были испытаны при других системных заболеваниях, например гипертонии, дислипидемии или диабете 2-го типа, и продемонстрировали лучший контроль над основными заболеваниями, а также снизили заболеваемость и смертность. Как элафибранор (агонист PPAR α/δ), так и ОХК (агонист FXR) показали эффективность при НАСГ и фиброзе в конечных точках недавних исследований 2B фазы. Авторы изобретения хотели сравнить их действие на соответствующие исходы при патологии НАСГ и определить терапевтические эффекты комбинации.

Для достижения этой цели гистологию НАСГ и фиброз индуцировали путем кормления крыс линии Вистар согласно L-аминокислотной диете с дефицитом холина, дополненной холестерином (диета CDAA/хол). Животные в экспериментальной группе получали или элафибранор, или ОХК, или оба соединения в течение всего периода исследования. НАСГ и развитие фиброза оценивали гистологически. Также проводились дополнительные биохимические и молекулярные анализы с различными соответствующими биомаркерами.

У крыс линии Вистар, получавших диету CDAA/хол, развилась связанная с НАСГ гистология и фиброз с высоким уровнем тяжелого поражения заболеванием. У всех животных наблюдался прогрессирующий стеатоз, лобулярное воспаление и балонная дистрофия, и балл по шкале оценки NAS варьировал от 6 до 8. Гистология печени (положительно окрашенная пикросириусом область) и биохимия (концентрация печеночного коллагена) показали в среднем четырехкратное увеличение содержания в печени фиброзной ткани, и балл оценки фиброза составлял или 3, или 4 для всех животных на диете CDAA/х, которые не получали медикаментозного лечения. Экспрессия генов, связанных с воспалением, окисли-

тельным стрессом, ремоделированием ткани и фиброзом, была увеличена и соответствовала профилям генной экспрессии, о которых сообщалось ранее у пациентов с тяжелым поражением НАСГ.

Введение только элафибранора и ОХК приводило к очень значительному ослаблению развития фиброза. Аналогичная эффективность при фиброзе наблюдалась у животных, которые получали оба соединения, хотя в значительно более низких дозах. Повреждение гепатоцитов, о котором судили по раздуванию, предотвращалось или ослаблялось элафибранором дозозависимым образом. Напротив, отдельно взятая ОХК продемонстрировала частичное ослабление баллонной дистрофии при дозах, которые были использованы в этом исследовании. Лобулярное воспаление ослаблялось элафибранором дозозависимым образом и в меньшей степени при использовании ОХК. Наконец, введение одного из препаратов-кандидатов частично ослабило увеличение маркеров ремоделирования ткани, воспаления и окислительного стресса, и комбинация обоих соединений была более эффективной по сравнению с любым отдельным агентом.

Таким образом, здесь показано, что синергическое действие элафибранора и ОХК на фиброз печени в модели НАСГ, индуцированной диетой CDAA/x, дает сравнимый терапевтический эффект при значительно более низких дозах обоих препаратов-кандидатов по сравнению с любым отдельным агентом. Исходя из этого исследования, можно достоверно ожидать, что дозы обоих препаратов-кандидатов могут быть снижены по меньшей мере в 1,5, 2, 2,5 или даже по меньшей мере в 3 раза для того, чтобы получить результаты, аналогичные начальной дозе каждого соединения, используемого по отдельности. Кроме того, элафибранор показал явный защитный эффект на фоне повреждения печени. Эффекты ОХК на баллонную дистрофию и лобулярное воспаление в этой модели были скорее незначительными. Из этого исследования можно сделать вывод, что комбинация элафибранор/ОХК будет полезна для более обширной категории пациентов, а соответствующее снижение терапевтической дозы уменьшит частоту побочных эффектов лекарственного препарата.

Пример 3. Комбинация ELA и CVC.

Материалы и методы.

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, Fluka, кат. № 41640). CVC поставлялся коммерчески фирмой "CLINISCIENCES" (ссыл: A13643-10, Серийный номер: 497223-25-3).

Безафибрат был синтезирован фирмой "Genfit".

Культура ЗКП человека.

Первичные звездчатые клетки печени человека (ЗКП) (InnoproT) культивировали в среде "STeCM" (ScienCell, кат. № 5301), дополненной 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, ScienCell, кат. № 0010), 1% пенициллина/стрептомицина (ScienCell, кат. № 0503) и добавкой для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, кат. № 5352). Для улучшения адгезии флаконы для культивирования клеток покрывали поли-L-лизинном (Sigma, кат. № P4707).

Подготовка композиций.

Двухкомпонентная матрица комбинаций (элафибранор/CVC).

Для этих экспериментов была создана "шахматная" матрица. Исходные CVC и элафибранор серийно разводили в ДМСО в серии из пяти точек в горизонтальном ряду (элафибранор) и в серии из шести точек в вертикальном ряду (ценикривирок) 96-луночного планшета. Впоследствии матрица комбинаций 6X7 была получена путем смешивания всех концентраций одного агента в соотношении 1:1. Опытные концентрации для каждого соединения были выбраны на основе соответствующей IC₅₀ каждого соединения в качестве отдельного агента, полученной путем измерения содержания α -SMA в модели ЗКП, стимулированных с помощью TGF β 1.

Активация ЗКП человека TGF β 1 и обработка соединением

Первичные звездчатые клетки печени человека (ЗКП) (InnoproT) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Затем для измерения α -SMA с помощью ИФА клетки высевали при плотности 2×10^4 клеток/лунку в 96-луночные планшеты.

На следующий день культуральную среду удаляли и клетки промывали ФБС (Invitrogen, кат. № 14190). ЗКП человека культивировали в течение 24 ч в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработки CVC, элафибранором, безафибратом и парными комбинациями CVC/элафибранор и CVC/безафибрат лишённые сыворотки ЗКП человека предварительно инкубировали в течение 1 ч с соединениями с последующим добавлением профиброгенных стимулов TGF- β 1 (PeproTech, кат. № 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде в течение дополнительных 48 ч.

ИФА α -SMA.

Уровень α -SMA измеряли с помощью "сэндвич"-варианта ИФА. Говоря кратко, лунки планшета для ИФА сначала покрывали иммобилизованным антителом (мышинное моноклональное анти-АСТА2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в ФБС + 0,2% Твин-20 в течение 1 ч добавляли блокирующий раствор, состоящий из ФБС + 0,2% БСА, после чего следовал еще один цикл промывки. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом на 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки добавляли идентифицирующее антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-АСТА2 антитело, Abnova) на 2 ч при комнатной температуре с

последующими тремя промывками. Для обнаружения сначала в течение 30 мин при комнатной температуре применяли стрептавидин, конъюгированный с HRP (R&D Systems, кат. № DY998). После промывки добавляли субстрат ТМБ HRB (BD, кат. № 555214) и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. После окисления ТМБ образует водорастворимый синий продукт реакции, который с добавлением серной кислоты становится желтым (останавливающий раствор), что позволяет точно измерять интенсивность при 450 нм, используя спектрофотометр. Полученный цвет прямо пропорционален количеству α -SMA, присутствующего в лизате.

Определение синергии методом разности по Блисссу.

Значения α -SMA, полученные с помощью метода ИФА, сначала преобразовывали в процентное ингибирование по сравнению с контролем TGF- β 1. Затем, используя эти процентные ингибирования, для определения синергических эффектов комбинаций лекарственных препаратов была определена разность по Блисссу. Сначала определяли ожидаемый балл аддитивизма по Блисссу (E) по формуле

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

где A и B - процентное ингибирование элафибранора (A) (или безафибрата) и цениквивирока (B) в данной дозе.

Разница между ожидаемым по Блисссу и наблюдаемым ингибированием комбинированного CVC/элафибранора (или безафибрата) в одной и той же дозе является баллом "Разности по Блисссу".

Балл разности по Блисссу = 0 указывает на то, что комбинированное лечение является аддитивным (как и ожидалось для эффектов в отдельности);

Балл разности по Блисссу > 0 указывает на активность, превышающую аддитивную (синергизм); и

Балл разности по Блисссу < 0 означает, что активность комбинации меньше аддитивной (антагонизм).

Для комбинаций элафибранор + CVC и безафибрат + CVC путем суммирования всех баллов по Блисссу был рассчитан дополнительный общий балл по Блисссу.

Для подтверждения синергизма экспериментальные значения, соответствующие наивысшему баллу по Блисссу для комбинации CVC/элафибранор, были построены в виде гистограммы.

Значимость наблюдаемых различий между CVC/элафибранором или CVC/безафибратом по сравнению с наиболее эффективным отдельным агентом определяли с помощью t-критерия Стьюдента. [*: p<0,05; *: p<0,01; **: p<0,001]

Результаты и выводы.

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов характерна для многих фиброзных заболеваний.

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

Агонист PPAR элафибранор обнаруживает антифибротическую активность в ЗКП человека, активированных профиброгенным цитокином TGF β 1. Маркер α -SMA был снижен на 80% с IC₅₀ 3,17 мкМ (фиг. 6A). Тем не менее другие агонисты PPAR, например безафибрат, продемонстрировали слабый антифиброзный профиль (фиг. 6C), что позволяет предположить, что агонисты PPAR не являются эквивалентными в отношении их антифибротических свойств. Отдельно взятый CVC во всех дозах не показал значительного эффекта в ЗКП, активированных TGF β (фиг. 6B). Чтобы оценить, может ли комбинация элафибранора с CVC синергически снижать фиброз, проводились эксперименты с матрицей комбинаций в ЗКП, индуцированных TGF β . Говоря кратко, растворы CVC и элафибранора серийно разбавляли в "шахматном" формате, создавая матрицу из 42 комбинаций, охватывающую большую панель комбинаций элафибранор/CVC. Путем расчета баллов разности по Блисссу была впервые определена синергия. Эти эксперименты показали, что элафибранор может синергизировать с CVC для снижения секреции α -SMA в активированных ЗКП (фиг. 7A и B). Один из лучших примеров синергизма показан на фиг. 7C с 5 мкМ каждого соединения. Несмотря на то, что 5 мкМ отдельно взятого CVC не проявляют какой-либо антифибротической активности, их добавление к 5 мкМ элафибранора может значительно синергически увеличивать активность элафибранор и достигать 60% ингибирования (по сравнению с 40% с 5 мкМ элафибранора). Напротив, комбинация CVC с безафибратом продемонстрировала гораздо более низкие баллы по Блисссу (фиг. 8A и B), и ни одна из комбинаций не дала статистически значимых результатов.

В заключение заявители обнаружили неожиданные антифибротические активности для комбинации ELA и CVC. Эти результаты показывают, что комбинация соединения по формуле (I) с CVC может быть синергической и может обеспечивать терапевтические эффекты при нескольких типах заболеваний, например, фиброзных заболеваний.

Пример 4. Комбинации элафибранора с селонсертибом (SEL), GKT-831 или GS-0976 (GS): оценка в мышинной модели фиброзирующего НАСГ (8 недель).

Профилактические эффекты комбинаций элафибранора с селонсертибом, GKT-831 или GS-0976 оценивали на мышцах, получавших L-аминокислотную диету с дефицитом холина (CDAA), дополненную 2% холестерина и 30% молочного жира и кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы 55 (55%

фруктозы/45% глюкозы для конечной концентрации 42 г/л) в питьевой воде Mells et al. J. Nutr. Biochem. 2015) (диета CDFF). Самцов мышей C57Bl/6J в возрасте 5-6 недель кормили согласно контрольной (CSAA) диете (n=4), CDFF (n=12) или CDFF с добавлением элафибранора (в дозе 1 или 3 мг/кг/сутки), селонсертиба (в дозе 30 мг/кг/сутки) или GKT-831 (в дозе 60 мг/кг/сутки) или GS-0976 (в дозе 10 мг/кг/сутки) отдельно или в комбинации (n=8 на группу) в течение 8 недель.

Массу тела, потребление пищи и воды контролировали дважды в неделю. В последний день лечения образцы плазмы получали методом отбора образцов крови из ретроорбитального синуса и после 6-часового периода голодания мышей умерщвляли. Печень быстро удаляли для биохимического и гистологического анализов. Все процедуры на животных выполняли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по правильному уходу и использованию лабораторных животных.

Гистология.

Заливка тканей и изготовление срезов.

Срезы печени фиксировали в 4%-ном растворе формалина. Затем кусочки печени промывали 30 мин в ФСБ и обезвоживали в растворах этанола (последовательные ванны 70-, 80-, 95- и 100%-ного этанола). Куски печени выдерживали в трех различных ваннах ксилола (Honeywell, кат. № 534056), а затем в двух сменах жидкого парафина (59°C). Затем кусочки печени помещали в лотки, которые аккуратно заполняли "Histowax®", чтобы полностью покрыть ткань.

Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, отделяли от лотков и хранили при комнатной температуре. Из блоков печени получали срезы толщиной 3 мкм.

Окрашивание гематоксилином/эозином/сафранином.

Срезы печени подвергали депарафинированию, регидратировали и выдерживали в течение 3 мин в гематоксилине Майера (Migom, кат. № F/C0303). Затем срезы печени промывали водой и выдерживали 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 выдерживали в течение 2 мин в сафранине, а также в конечном итоге обезвоживали и монтировали с использованием среды "CV Mount medium" (Leica, кат. № 046430011).

Окрашивание пикросириусом красным.

Срезы печени подвергали депарафинированию, регидратировали и перед промывкой в ванне 0,5%-ной уксусной кислоты (Panreac, кат. № 131008.1611) выдерживали в течение 15 мин в 0,1%-ном растворе Fast Green FCF (Sigma-Aldrich, кат. № F7258). Затем срезы печени промывали водой и инкубировали 30 мин в 0,1%-ном растворе сириуса красного (Direct Red 80, Fluka, кат. № 43665) в насыщенной водной пикриновой кислоте (Sigma-Aldrich, кат. № P6744). Затем срезы обезвоживали и монтировали с использованием среды "CV Mount medium" (Leica, кат. № 14046430011).

Гистологические исследования.

Гистологические исследования проводил специалист, работающий с обезличенными данными по источнику каждого образца печени. Виртуальные слайды были получены с использованием сканера "Panoptamic 250" от фирмы-производителя "3D Histech". Баллы, суммирующие основные гистологические поражения при НАСГ, определялись по данным "Сети клинических исследований НАСГ" (Kleiner 2005, Brunt 1999) для каждого животного. Говоря кратко, оценивали стеатоз, лобулярное воспаление и балонную дистрофию гепатоцитов. Балл по шкале оценки активности НАЖБП (NAS) устанавливался для каждого испытуемого животного как невзвешенная сумма определения степени выраженности стеатоза (0-3), лобулярного воспаления (0-3) и балонной дистрофии (0-2).

Используя программное обеспечение "Quant Center" ("3D Histech", включая модули "Pattern Quant" и "Histo Quant"), определяли количество участков с окрашенным коллагеном. Говоря кратко, модуль "Pattern Quant" использовали для обнаружения ткани и измерения ее поверхности. Затем использовали модуль "Histo Quant" для определения содержания окрашенного коллагена и измерения его поверхности на основе метода цветового порога. Площадь фиброза затем выражали в процентах от поверхности коллагена ко всей ткани на одно животное.

Биохимический анализ образцов печени.

Измерение содержания печеночного коллагена.

Содержание печеночного коллагена определяли с помощью соответствующего набора "QuickZyme" (Анализ общего коллагена, кат. № QZB-totcol2). Анализ основан на обнаружении гидроксипролина, который является непротеиногенной аминокислотой, найденной, в основном, в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в тканевых гидролизатах можно использовать в качестве прямого показателя количества коллагена, присутствующего в ткани (без различия между проколлагеном, зрелым коллагеном и продуктами распада коллагена).

Перед дозированием гидроксипролина необходим полный гидролиз образцов тканей в 6 М HCl при 95°C. Анализ приводит к образованию хромогена с максимальной поглощающей способностью при 570 нм. Результаты выражены в виде мг коллагена/г печени.

Измерение содержания печеночных триглицеридов.

Приблизительно 100 мг замороженной ткани печени гомогенизировали с помощью гомогенизатора

ткани (Precellys®24, Bertin Technologies, Франция) в 150 мМ буфера NaCl, содержащем 15,4 мМ NaN₃. Липидные фракции в гомогенатах экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1, об./об.) с последующим измерением триглицеридов (Biolabo, кат. № 80019).

Измерение N-терминального пропептида плазменного проколлагена III (P1INP).

Плазматическую концентрацию P1INP определяли с помощью метода ИФА, используя набор от фирмы "Cloud-Clone Corp" (кат. № SEA573Mu), в соответствии с инструкциями производителя. Микротитрационный планшет предварительно покрыт антителом, специфичным к P1INP. Стандарты или образцы добавляют в соответствующие лунки микротитрационного планшета с биотинилированным антителом, специфичным к P1INP. Затем в каждую лунку микропланшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. После добавления раствора субстрата ТМБ только те лунки, которые содержат P1INP, биотинилированное антитело и авидин, конъюгированный с ферментом, будут демонстрировать изменение цвета. Фермент-субстратную реакцию останавливали добавлением раствора серной кислоты и изменение цвета измеряли спектрофотометрически при длине волны 450±10 нм. Концентрацию P1INP в образцах затем определяли путем сравнения OD образцов с калибровочной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Измерение плазменного тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (TIMP-1).

Уровни TIMP-1 в плазме крови измеряли с помощью количественного "сэндвич"-варианта метода ИФА, используя набор от фирмы "R&D Systems" (кат. № MTM100), в соответствии с экспериментальным протоколом PRO LIDO 000020. Говоря кратко, моноклональное антитело, специфичное к мышшиному TIMP-1, было предварительно нанесено на микропланшет. Стандарты, контроль и образцы пипеткой вносили в лунки, и любой присутствующий TIMP-1 мыши связывался с иммобилизованным антителом. После промывки любых несвязанных веществ в лунки добавляли специфичное к мышшиному TIMP-1 поликлональное антитело, связанное с ферментом. После промывки для удаления любого несвязанного реагента антитело-фермент в лунки добавляют раствор субстрата. Ферментативная реакция образует синий продукт, который становится желтым при добавлении стоп-реагента. Интенсивность измеренного цвета пропорциональна количеству мышшиного TIMP-1, связанного на начальном этапе. Затем значения выборки рассчитывали по стандартной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Анализ экспрессии генов печени.

Тотальную РНК выделяли из печени мышей с помощью набора "Rneasy Mini Kit" (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Тотальную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV RT (ревертазы вируса мышшиного лейкоза Молони) (Invitrogen, кат. № 28025) в 1× буфере RT (Invitrogen), 0,5 мМ DTT (Invitrogen), 0,18 мМ смеси dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Amersham) и 30 ед. ингибитора РНКаз (Promega).

Затем проводили количественную ПЦР с использованием системы обнаружения ПЦР-анализатора реального времени "CFX96 Touch™" (BioRad). Говоря кратко, ПЦР проводили в формате 96-луночного планшета в 25 мкл общего объема, содержащего 1 мкл реакции с обратной транскрипцией, 0,5 мкл обратных и прямых праймеров (по 10 пмоль каждый) и 12,5 мкл 2X "iQ SYBR Green Supermix" (BioRad), используя следующие последовательности праймеров:

Ген	Прямой	Обратный
GAPDH	TATGACTCCACTCACGGCAA (SEQ ID NO:11)	TCCACGCATACTCAGCACC (SEQ ID NO:12)
Col1a1	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (SEQ ID NO:13)	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SEQ ID NO:14)
TGFβ1	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA (SEQ ID NO:15)	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC (SEQ ID NO:16)
ССК2	ТААТАТГТТАССТСАГТТКАТССА СГГ (SEQ ID NO:17)	TGCTCTTCAGCTTTTACAGCCTA TC (SEQ ID NO:18)
MMP2	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC (SEQ ID NO:19)	GCTTCCAAACTTCACGCTCT (SEQ ID NO:20)
ФНОα	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG (SEQ ID NO:21)	AGACAGAAGAGCGTGGTGCC (SEQ ID NO:22)

Уровни экспрессии нормализовали, используя экспрессию гена GAPDH в качестве референсного гена "домашнего хозяйства" в образцах. Для каждого гена калибровочные кривые строили путем выбора наилучших точек (по меньшей мере трех точек), чтобы иметь эффективность ПЦР, близкую к 100%, и коэффициент корреляции, близкий к 1. Уровни экспрессии определяли, используя уравнение калибровочной кривой как для генов "домашнего хозяйства", так и для целевого гена (принимая во внимание специфическую эффективность ПЦР для каждого целевого гена).

Результаты и выводы.

Элафибранор, селонсертиб, GKT-831 и GS-0976 показали эффективность при НАСГ и фиброзе в конечных точках недавних клинических испытаний. Авторы изобретения хотели сравнить их действие на соответствующие исходы при патологии НАСГ и определить терапевтические эффекты комбинации. Для достижения этой цели НАСГ индуцировали путем кормления мышей C57Bl/6J согласно L-аминокислотной диете с дефицитом холина, дополненной холестерином и молочным жиром, и кукурузным сиропом с высоким содержанием фруктозы в питьевой воде (диета CDFF). Животные в экспериментальных группах получали или элафибранор, селонсертиб, GKT-831 или GS-0976 отдельно, или в комбинации с элафибранором в течение всего периода исследования.

Развитие НАСГ оценивали с помощью гистологических и биохимических измерений и по печеночной экспрессии генов, участвующих в путях, имеющих отношение к патологии НАСГ.

У мышей, получавших диету CDFF, развился НАСГ с высоким уровнем тяжелого поражения заболеванием. У всех животных наблюдались прогрессирующий стеатоз и лобулярное воспаление, что привело к высокому баллу по шкале оценки NAS, составившему 6 или 7 (фиг. 15C). Экспрессия генов, связанных с фиброгенезом, ремоделированием ткани и воспалением, была увеличена и соответствовала профилям генной экспрессии, о которых сообщалось ранее у пациентов с тяжелым поражением НАСГ (фиг. 14E-I).

В этой модели элафибранор (3 мг/кг/сутки) улучшает гистологию НАСГ, уменьшая стеатоз и лобулярное воспаление печени, что приводит к общему снижению по баллов по шкале оценки активности НАЖБП (не показано). Элафибранор также уменьшает экспрессию генов, связанных с воспалением, ремоделированием ткани и фиброгенезом (фиг. 14E-I), что приводит к заметному снижению фиброза печени, оцениваемого с помощью гистологии, по содержанию печеночного коллагена и высвобождению PIIINP и TIMP-1 в крови (фиг. 14A-D).

Отдельно взятый селонсертиб (30 мг/кг/сутки) снижал фиброз печени в этой модели, хотя и в меньшей степени, чем элафибранор (фиг. 14). Комбинация элафибранора (3 мг/кг/сутки) и селонсертиба (30 мг/кг/сутки) приводила к синергическому положительному эффекту на фиброз печени (оцениваемого по гистологии, содержанию печеночного коллагена и высвобождению PIIINP и TIMP-1), а также на печеночную экспрессию генов, участвующих в фиброгенезе, ремоделировании тканей и воспалении (фиг. 14).

Отдельно взятый GKT-831 (60 мг/кг/сутки) не оказывал положительного эффекта на НАСГ и фиброз в этой модели. Тем не менее в комбинации с субоптимальной дозой элафибранора (1 мг/кг/сутки) он уменьшал воспалительные инфильтраты в печени, балл по шкале оценки активности НАЖБП и фиброз (фиг. 15).

Лечение GS-0976 (30 мг/кг/сутки) оказало умеренное положительное действие на жир в печени и массу тела в этой модели (фиг. 16). Тем не менее комбинация с элафибранором в субоптимальной дозе (1 мг/кг/сутки) привела к синергическому эффекту сжигания жира всего тела, что привело к потере массы тела на 20% и заметному снижению стеатоза печени и содержания триглицеридов (фиг. 16).

В заключение авторы изобретения обнаружили синергические эффекты между элафибранором и MSDC-0602, PXS-4728, MT-3995 (апареноном), CF-102 (намоденоном), висмодегибом, PBI-4050, гемкабеном, CP-640186, GS-0976, JKB-121 (налмефеном), VK-2809, MGL-3196, арамолом, эмрикасаном, DUR-928 (25-гидроксихолестерол-3-сульфата), селонсертиба, KD-025 или GKT-831.

Ссылочные материалы

1. Brunt E.M. et al., 1999, Am. J. Gastroenterol.; 94(9):2467-74.
2. Kleiner D.E. et al., 2005, Hepatology; 41(6):1313-21.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение комбинированного лекарственного препарата для лечения фиброзного заболевания, где лекарственный препарат включает:

- (i) элафибранор или его фармацевтически приемлемую соль и
- (ii) ингибитор АКК, выбранный из группы, состоящей из гемкабена, CP-640186 и GS-0976 или фармацевтической соли вышеперечисленного.

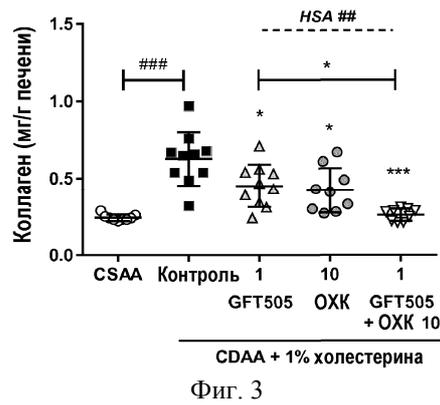
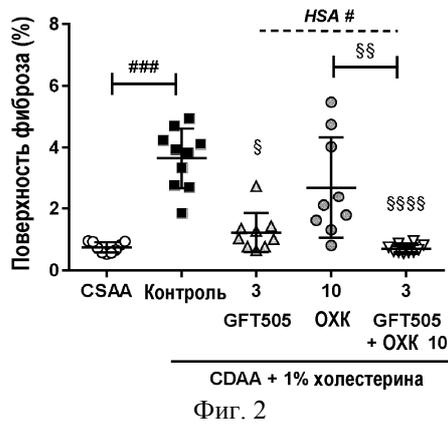
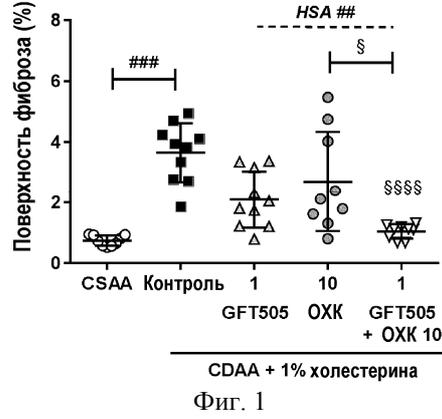
2. Применение по п.1, где комбинированный лекарственный препарат представляет собой композицию, содержащую компоненты (i) и (ii) и фармацевтически приемлемый носитель.

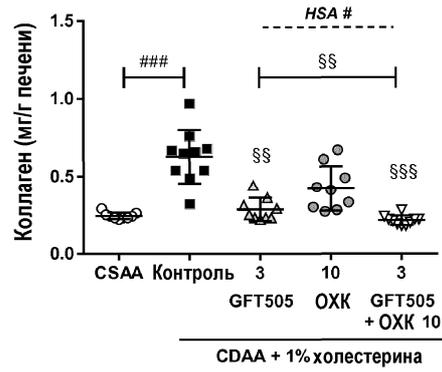
3. Применение по п.1 или 2, где комбинированный лекарственный препарат представляет собой составной комплект, включающий компоненты (i) и (ii) для последовательного, раздельного или одновременного использования.

4. Применение по любому из пп.1-3, где компоненты (i) и (ii) составляют в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или с использованием галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

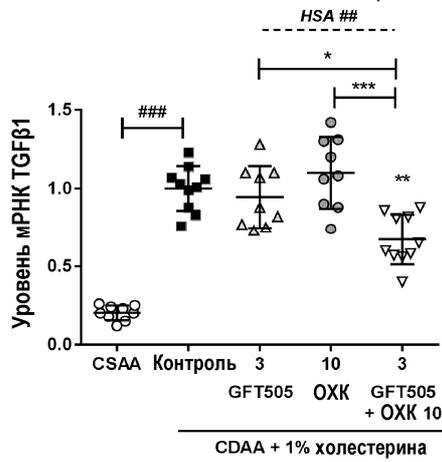
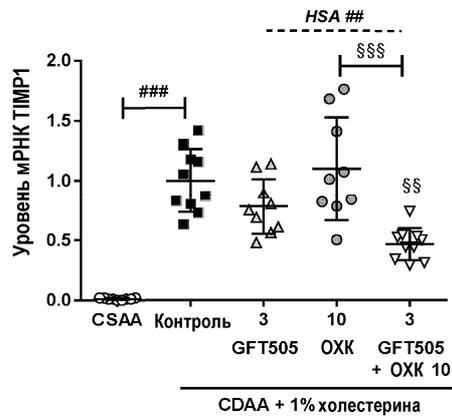
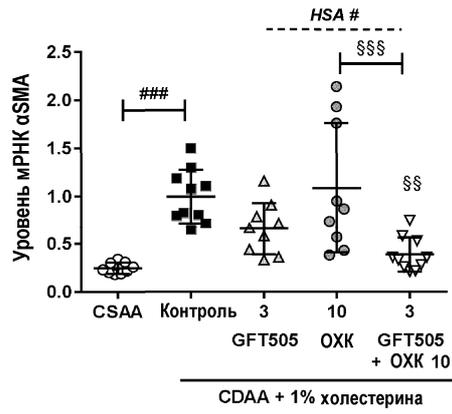
5. Применение по п.1, где фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы,

легкого, матки, нервной системы, яичка, полового член, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечного тракта (например, тонкой кишки), желчных путей, мягкой ткани (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, сустава и желудка, в частности фиброза печени, кишечника, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягкой ткани, костного мозга, интестинального фиброза, фиброза глаза и сустава.

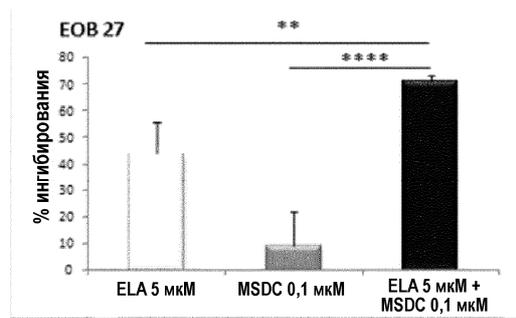
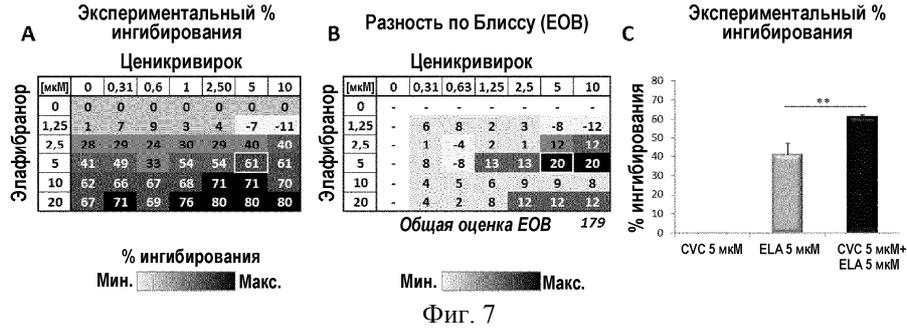
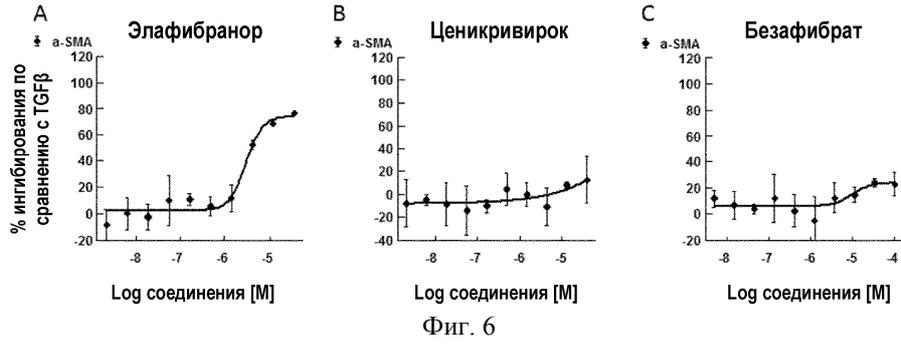




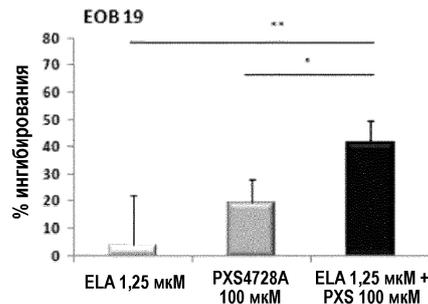
Фиг. 4

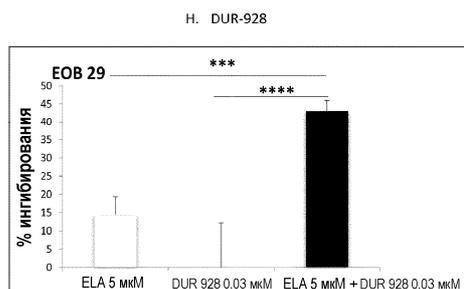
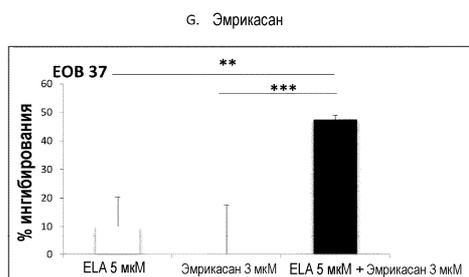
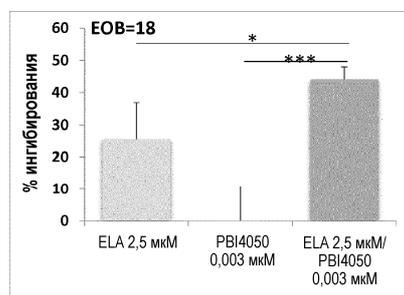
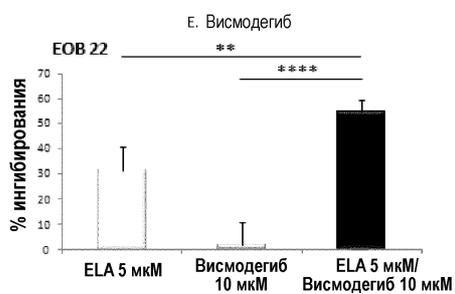
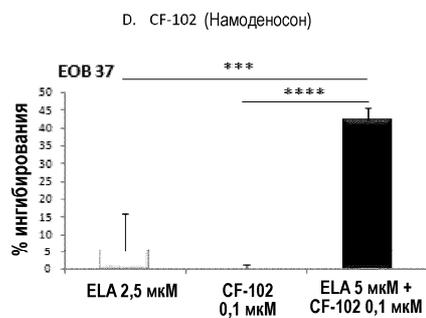
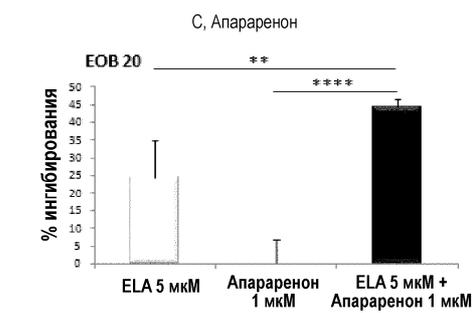


Фиг. 5

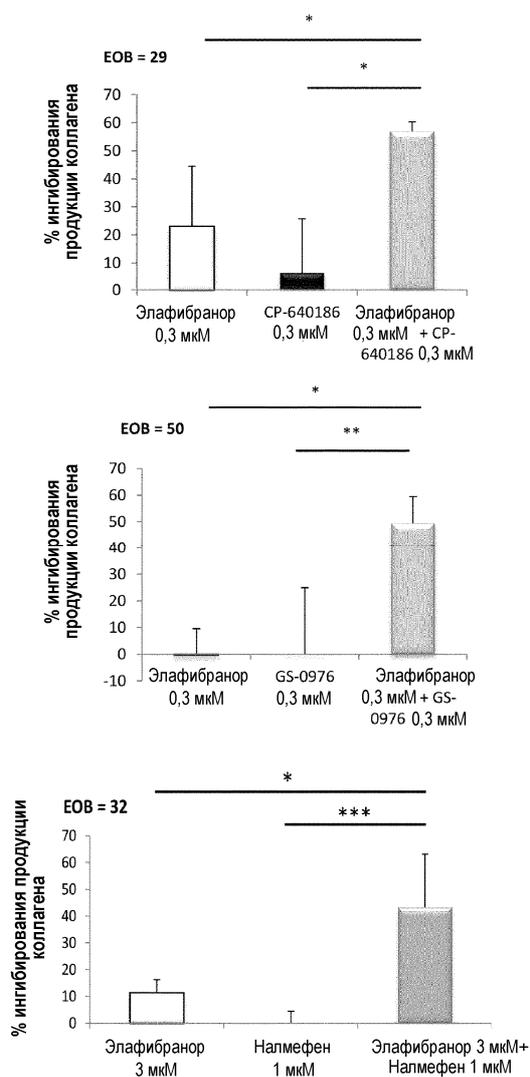


В. PXS-4728A (BI-1467335)

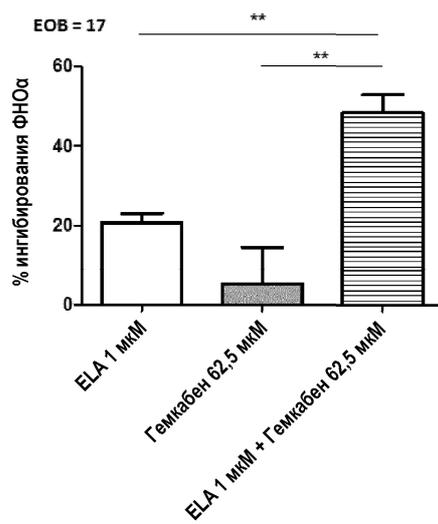




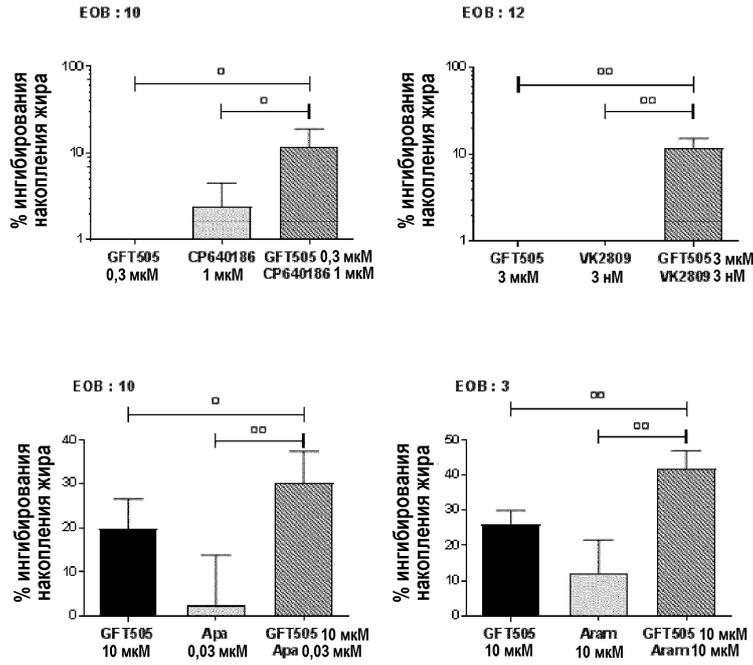
Фиг. 9



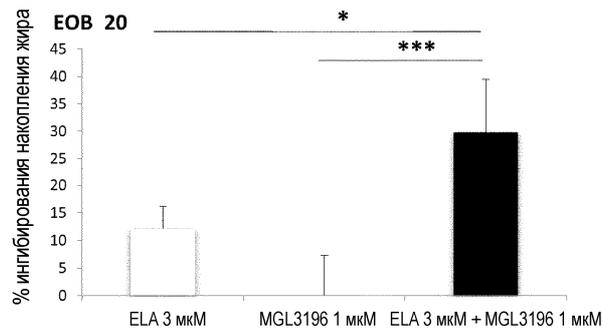
Фиг. 10



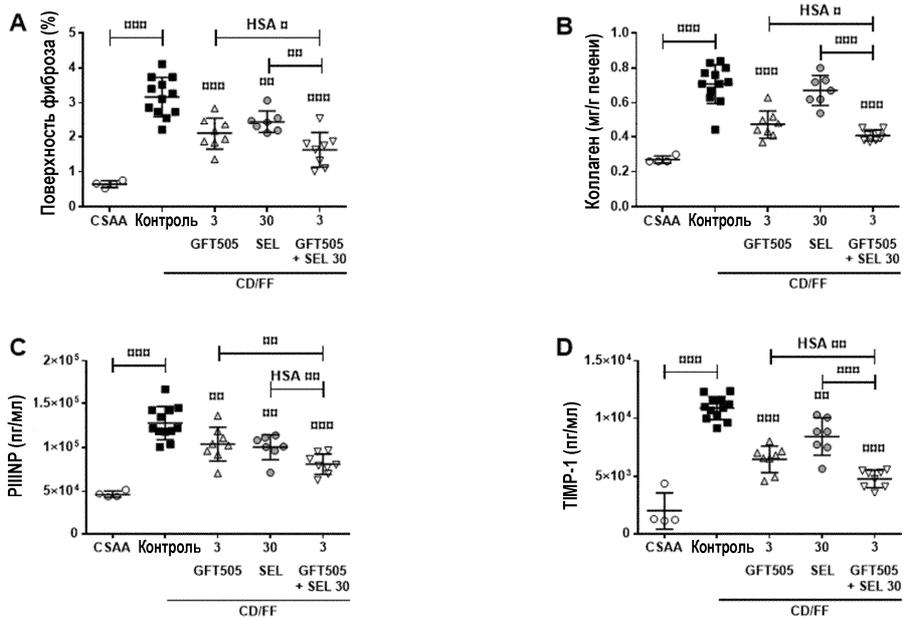
Фиг. 11

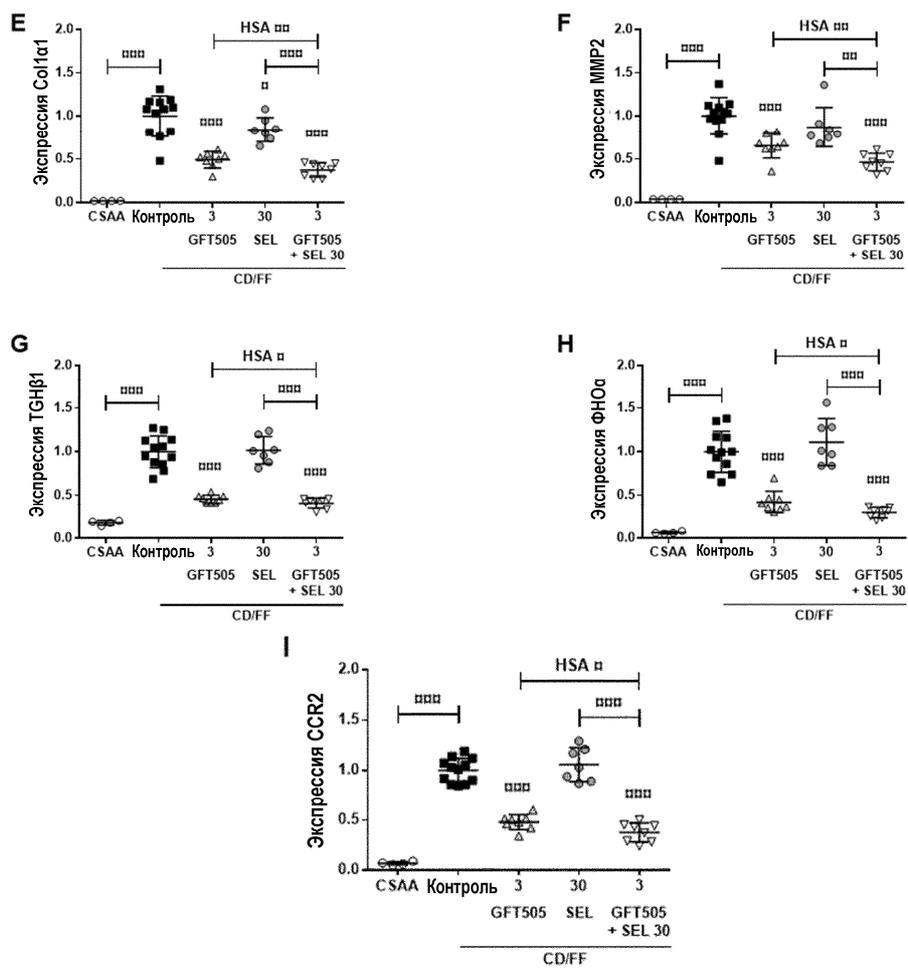


Фиг. 12

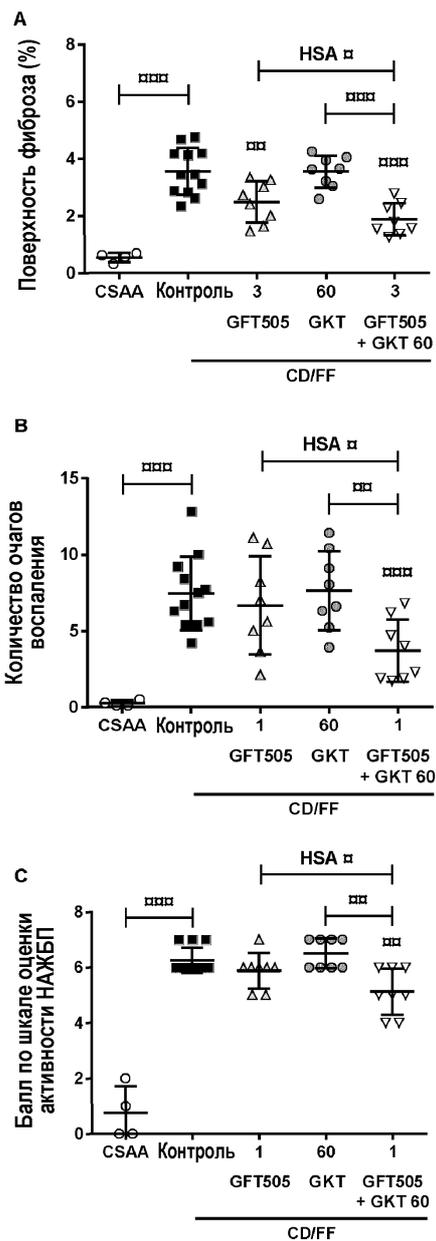


Фиг. 13

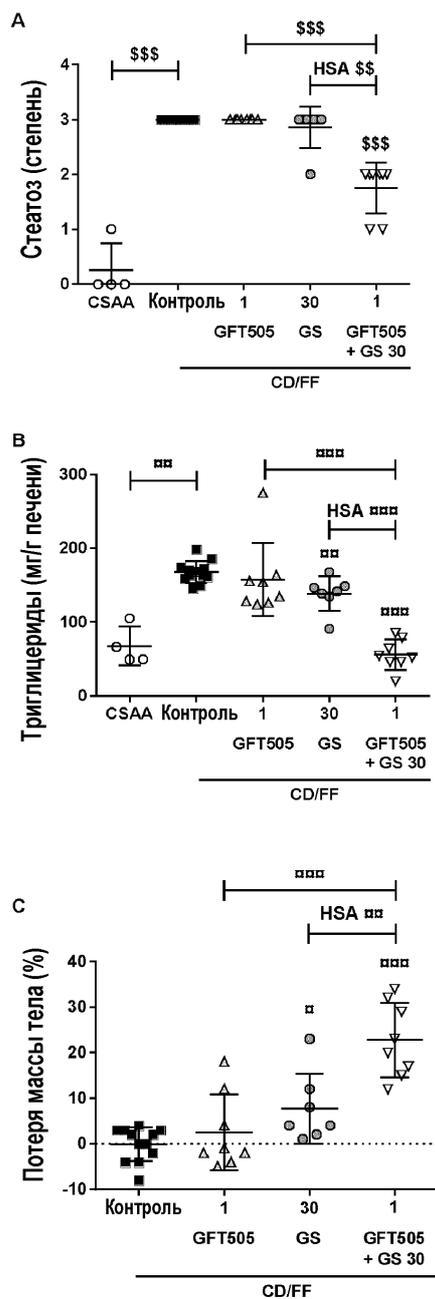




Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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