

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491203 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.01

(51) Int. Cl. *A61K 31/53* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.11

(54) ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ С ПОМОЩЬЮ АГОНИСТА THR- β

(31) PCT/CN2021/130083;
PCT/CN2022/097426

(32) 2021.11.11; 2022.06.07

(33) CN

(86) PCT/CN2022/131297

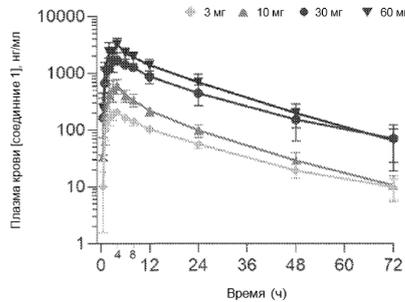
(87) WO 2023/083288 2023.05.19

(71) Заявитель:
ТЕРНС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Джоунс Кристофер Т., Клачер Кевин,
Криттенден Д. Барри, Квирк Эрин К.,
Цзин Фэн, Дуан Мэтт, Го Шэн, Бянь
Цзяньвэй, Дун Цяньцян (US)

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

(57) В изобретении представлены способы лечения заболеваний печени, включая неалкогольный стеатогепатит, и их симптомов и проявлений, у пациента, в которых применяют лечение агонистом THR- β .



A1

202491203

202491203

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581107EA/081

ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ С ПОМОЩЬЮ АГОНИСТА THR-β ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет РСТ/CN2021/130083, поданной 11 ноября 2021 г., и РСТ/CN2022/097426, поданной 7 июня 2022 г. Содержание вышеупомянутых патентных заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения нарушения печени у пациента.

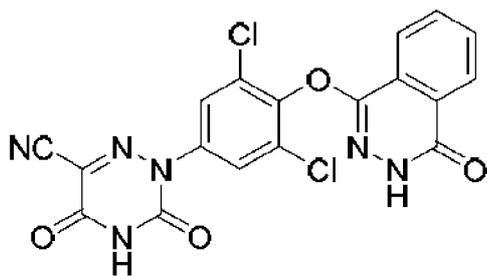
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Жировая болезнь печени (FLD) охватывает спектр болезненных состояний, характеризующихся избыточным накоплением жира в печени, часто сопровождающимся воспалением. FLD может приводить к неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), которая может характеризоваться инсулинорезистентностью. При отсутствии лечения NAFLD может прогрессировать до стойкого воспалительного ответа или неалкогольного стеатогепатита (NASH), прогрессирующего фиброза печени и в конечном итоге до цирроза. В Европе и США NAFLD является второй наиболее распространенной причиной трансплантации печени. Соответственно, потребность в лечении является неотложной, но в связи с отсутствием очевидных симптомов у пациента у пациентов может отсутствовать мотивация придерживаться режимов лечения, в частности, обременительных режимов лечения, таких как инъекционные лекарственные препараты, лекарственные препараты, которые вводят много раз в день, или любые препараты, которые вызывают опасные или раздражающие побочные эффекты. В настоящее время не существует одобренного лечения NASH.

[0004] Агонисты рецептора бета-тиреоидного гормона (THR-β) недавно были исследованы при лечении заболеваний печени, включая NASH. THR-β является основной формой THR в печени и играет ключевую роль в энергетическом балансе и метаболизме жирных кислот и липидов, тогда как THR-α преобладает в сердце и отвечает за большинство нежелательных сердечно-сосудистых эффектов стимуляции гормонов щитовидной железы. Существенная проблема, которую необходимо преодолеть, включает разработку агониста THR-β для лечения NASH, который не будет вызывать нежелательных побочных эффектов, ассоциированных с агонизмом THR-α.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе представлены способы и композиции для лечения нарушения печени у пациента, нуждающегося в этом. Способы включают введение пациенту агониста бета-рецептора гормона щитовидной железы (THR-β), называемого в данном документе соединением 1, или его фармацевтически приемлемой соли.



Соединение 1

Соединение 1, которое имеет химическое название 2-(3,5-дихлор-4-((4-оксо-3,4-дигидрофталазин-1-ил)окси)фенил)-3,5-диоксо-2,3,4,5-тетрагидро-1,2,4-триазин-6-нитрил, описано в патенте США № 11084802, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0006] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить пациентам, страдающим нарушениями печени, в неожиданно низких дозах, сохраняя при этом требуемый уровень эффективности. В результате соединение 1 можно применять для лечения нарушений печени без нежелательных побочных эффектов, обычно ассоциированных с агонизмом THR.

[0007] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить пациентам перорально один раз в день в дозах от 1 мг или меньше и при этом в достаточной степени снижать активность аминоксидазы и снижать адгезию и трансмиграцию лимфоцитов. Например, соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 60 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 25 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 15 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 3 мг до приблизительно 10 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 1 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день

пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 4 мг. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 5 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 6 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 10 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 15 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 30 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 60 мг.

[0008] В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения или предупреждения NASH у пациента, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления пациент, нуждающийся в этом, представляет собой пациента, который страдает от жировой болезни печени, такой как NAFLD. В другом варианте осуществления пациент, нуждающийся в этом, представляет собой пациента, который страдает метаболическим синдромом.

[0009] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы уменьшения воспаления печени у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. Уменьшение воспаления печени характеризуется снижением экспрессии воспалительных генов и маркеров активации лейкоцитов в печени. В некоторых вариантах осуществления воспаление печени уменьшается без повышения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) в крови пациента.

[0010] В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания или состояния, характеризующихся фиброзом печени, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его

фармацевтически приемлемой соли. Уменьшение фиброза характеризуется гистологическим улучшением и снижением экспрессии профиброзных генов в печени. В некоторых вариантах осуществления фиброз печени уменьшается без повышения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) в крови пациента. В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли приводит к уменьшению фиброза печени и воспаления печени.

[0011] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет нарушение печени и сахарный диабет. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет нарушение печени и сердечно-сосудистое нарушение. В некоторых вариантах осуществления период лечения представляет собой оставшуюся продолжительность жизни пациента. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение антигистамина, иммунодепрессанта, стероида, рифампицина, опиоидного антагониста или селективного ингибитора обратного захвата серотонина (SSRI).

[0012] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 вводят пациенту в виде фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

[0013] В настоящем изобретении также представлены новые композиции, содержащие соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль. Соединение 1 имеет очень низкую растворимость в воде, даже при введении в форме соли. Было обнаружено, что конкретные ионные поверхностно-активные вещества могут эффективно солюбилизировать соединение 1 и его фармацевтически приемлемые соли с минимальным распадом соединения или без него. В некоторых вариантах осуществления ионное поверхностно-активное вещество представляет собой лаурилсульфат натрия. В некоторых таких вариантах осуществления количество SLS в композиции составляет от приблизительно 1% до приблизительно 8% по массе. В других таких вариантах осуществления количество SLS в композиции составляет приблизительно 5% по массе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит калиевую соль соединения 1 и SLS.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На фиг. 1 показана концентрация соединения 1 в плазме крови у пациентов в течение до 72 часов после введения однократной дозы соединения 1.

[0015] На фиг. 2 показана площадь под кривой (AUC_{inf}) и максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) соединения 1 у пациентов, нанесенная на график в зависимости от введенной дозы.

[0016] На фиг. 3 показан средний процент изменения глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG), через 4 дня после введения однократной дозы соединения 1.

[0017] На фиг. 4 показан средний процент изменения аполипопротеина В (Apo B) через 4 дня после введения однократной дозы соединения 1.

[0018] На фиг. 5 показаны свободные T3, T4 и TSH в день 15 через 14 дней ежедневного введения человеку соединения 1 или плацебо.

[0019] На фиг. 6 показан процент изменения свободного тестостерона, общего тестостерона и глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG), по сравнению с исходным уровнем в день 15 через 14 дней ежедневного введения людям соединения 1 или плацебо.

[0020] На фиг. 7 показаны концентрации соединения 1 в плазме крови с течением времени в дни 1 и 14 исследования с многократным повышением дозы, в котором соединение 1 вводили один раз в день.

[0021] На фиг. 8 показан процент изменения маркеров фармакодинамики (глобулина, связывающего половые гормоны, ApoB, общего холестерина, LDL-с, HDL-с и триглицеридов) от исходного уровня в день 15 через 14 дней ежедневного введения людям соединения 1 или плацебо.

[0022] На фиг. 9 показано влияние соединения 1 на массу тела и органов в мышинной модели NASH.

[0023] На фиг. 10 показано влияние соединения 1 на стеатоз печени, воспаление и фиброз в мышинной модели NASH.

[0024] На фиг. 11 показано влияние соединения 1 на липиды и показатели поражения печени (ALT) в мышинной модели NASH.

[0025] На фиг. 12 показано влияние соединения 1 на экспрессию генов, ассоциированных с активацией коллагенового внеклеточного матрикса и звездчатых клеток печени.

[0026] На фиг. 13 показана концентрация соединения 1 в плазме крови у собак породы бигль после введения однократной дозы 50 мг, представленной в одном из двух пероральных составов (PO1 или PO2).

[0027] На фиг. 14 показана концентрация соединения 1 в плазме крови в двух группах собак породы бигль после введения однократной дозы 10 мг, представленной в пероральном составе PO3. Одну группу предварительно обрабатывали пентагастрином, в то время как другую группу предварительно обрабатывали фамотицином.

[0028] На фиг. 15 показана концентрация соединения 1 в плазме крови у собак породы бигль натошак и после приема пищи после введения однократной дозы 10 мг, содержащейся в пероральном составе PO3.

[0029] На фиг. 16 показан спектр XRPD соединения 1, формы калиевой соли, тип А.

[0030] На фиг. 17 показан спектр XRPD соединения 1, формы свободной кислоты, тип А.

[0031] На фиг. 18 показан спектр XRPD соединения 1, формы натриевой соли, тип А.

[0032] На фиг. 19 показан спектр XRPD соединения 1, формы соли L-аргинина, тип А.

[0033] На фиг. 20 показан спектр XRPD соединения 1, формы магниевой соли, тип А.

[0034] На фиг. 21 показан общий дизайн исследования для соединения 1.

[0035] На фиг. 22 показаны демографические данные и исходные характеристики для соединения 1.

[0036] На фиг. 23 показан профиль зависимости концентрации в плазме крови от времени, день 14, для соединения 1.

[0037] На фиг. 24 показаны PK параметры соединения 1 в день 14.

[0038] На фиг. 25 показан уровень глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG) (процент изменения по сравнению с исходным уровнем к дню 15).

[0039] На фиг. 26 показан уровень LDL-с (процент изменения по сравнению с исходным уровнем к дню 15).

[0040] На фиг. 27 показан процент изменения по сравнению с исходным уровнем в конце лечения (день 15) для SHBG и LDL-с на дозу соединения 1.

[0041] На фиг. 28 показано снижение общего холестерина (TC), Apo B и триглицеридов (TG) на дозу соединения 1.

[0042] На фиг. 29 показано, что нежелательные явления, возникшие в ходе лечения, были легкими и в основном не связаны с существенными изменениями основных показателей жизнедеятельности.

[0043] На фиг. 30А и фиг. 30В показано изменение массы тела у самцов мышей DIO-NASH, подтвержденное биопсией. Соединение 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 снижало массу тела. Массу тела измеряли ежедневно во время исследования. Изменение массы тела во время исследования показано на фиг. 30А, где точки представляют среднее изменение массы тела по сравнению с исходным уровнем (n=10-16 мышей на группу). На фиг. 30В столбцы представляют собой среднюю (SD) массу тела, измеренную на неделе 11 исследования. контроль нежирной несущей средой, белый цвет; контроль несущей средой DIO-GAN, серый цвет; соединение 2, синий цвет; соединение 1 - низкий уровень, светло-оранжевый цвет; соединение 1 - средний уровень, оранжевый цвет; соединение 1 - высокий уровень, темно-оранжевый цвет; комбинир. - низкий уровень, светло-фиолетовый цвет; комбинир. - средний уровень, фиолетовый цвет; комбинир. - высокий уровень, темно-фиолетовый цвет. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0044] На фиг. 31 показано дискретное еженедельное потребление пищи во время исследования. Точки представляют среднее еженедельное потребление пищи в граммах (n=10-16 мышей на группу). контроль нежирной несущей средой, белый цвет; контроль несущей средой DIO-GAN, серый цвет; соединение 2, синий цвет; соединение 1 - низкий уровень, светло-оранжевый цвет; соединение 1 - средний уровень, оранжевый цвет; соединение 1 - высокий уровень, темно-оранжевый цвет; комбинир. - низкий уровень,

светло-фиолетовый цвет; комбинир. - средний уровень, фиолетовый цвет; комбинир. - высокий уровень, темно-фиолетовый цвет.

[0045] На фиг. 32А и фиг. 32В показана масса печени и селезенки. Соединение 2 и соединение 1 отдельно и в комбинации значительно снижали гепатомегалию без изменений массы селезенки. Столбцы представляют собой средние (SD) массы органов для печени (фиг. 32А) и селезенки (фиг. 32В) (n=10-16 мышей на группу), определенные в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0046] На фиг. 33А и фиг. 33В показан состав массы тела на исходном уровне. Состав массы тела был хорошо сбалансирован во всех группах обработки на исходном уровне (неделя -1). Столбцы представляют собой среднюю (SD) массу жировой ткани (фиг. 33А) и мышечной ткани (фиг. 33В) в процентах от массы тела (%BW, n=10-16 мышей на группу), определенную с помощью EchoMRI всего тела на неделе -1 исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0047] На фиг. 34А и фиг. 34В показан состав массы тела на неделе 11. Соединение 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 значительно уменьшает массу жировой ткани. Столбцы представляют собой среднюю (SD) массу жировой ткани (фиг. 34А) и мышечной ткани (фиг. 34В) в процентах от массы тела (%массы тела, n=10-16 мышей на группу), определенную с помощью EchoMRI всего тела на 11 неделе исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0048] На фиг. 35А и фиг. 35В показан общий холестерин в плазме крови и печени. Соединение 2 и соединение 1 отдельно и в комбинации значительно снижали общий холестерин. Столбцы представляют собой средние (SD) уровни общего холестерина, измеренные в конце исследования (n=10-16 мышей на группу) в плазме крови (фиг. 35А) и печени (фиг. 35В). Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0049] На фиг. 36А и фиг. 36В показаны триглицериды в плазме крови и печени. Соединение 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 значительно снижает уровень триглицеридов в плазме крови. Столбцы представляют собой средние (SD) уровни триглицеридов, измеренные в конце исследования (n=10-16 мышей на группу) в плазме крови (фиг. 36А) и печени (фиг. 36В). Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0050] На фиг. 37А и фиг. 37В показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) и

аспартатаминотрансферазы (AST). Соединение 1 отдельно значимо снижало уровни аланинаминотрансферазы (ALT). Столбцы представляют средние уровни (SD) ALT (фиг. 37A) и аспартатаминотрансферазы (AST) (фиг. 37B) (n=10-16 мышей на группу), определенные в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0051] На фиг. 38 показаны уровни щелочной фосфатазы. Уровни щелочной фосфатазы (ALP) при обработке значимо не изменялись. Столбцы представляют собой средние (SD) уровни ALP (n=10-16 мышей на группу), определенные в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

[0052] На фиг. 39A и фиг. 39B показан индекс активности NAFLD (NAS) на исходном уровне и в конце обработки. Индекс активности NAFLD (NAS) был хорошо сбалансирован на исходном уровне и значимо улучшился в группах комбинированной обработки. NAS, определяемый как составная, невзвешенная сумма гистологических баллов баллонирования, стеатоза и лобулярного воспаления, определяли на исходном уровне (фиг. 39A) и через 12 недель обработки (фиг. 39B). Точки представляют отдельных мышей в каждой группе обработки (n=14-16). Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0053] На фиг. 40A и фиг. 40B показан стеатоз печени на основе гистологического морфометрического анализа. Комбинация соединения 2 и соединения 1 приводила к более высокому снижению стеатоза печени, как определено с помощью гистологического морфометрического анализа. Гепатоцеллюлярный стеатоз, включая процент гепатоцитов с липидными каплями и содержанием липидов в печени в виде процента фракционной площади (FA), определяли путем морфометрического анализа гистологических образцов печени в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0054] На фиг. 41 показан размер капель липидов гепатоцитов. Комбинированная обработка значимо уменьшает размер капель липидов в гепатоцитах. Размер липидных капель определяли с помощью морфометрического анализа гистологических образцов печени в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0055] На фиг. 42 показан уровень СК18 М30 в плазме крови. Уровни биомаркера апоптоза цитокератина 18 М30 (СК18 М30) значимо не изменялись при обработке. СК18 М30, биомаркер апоптоза, измеряли в образцах плазмы крови в конце исследования.

Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0056] На фиг. 43А и фиг. 43В показана экспрессия белка печени галектина-3 и гладкомышечных актиновых белков. Обработка соединением 2 снижает экспрессию галектина-3 (Gal-3). Экспрессию Gal-3 (фиг. 43А) и α -гладкомышечного актина (α -SMA) (фиг. 43В) оценивали с помощью иммуногистохимического (ИНС) окрашивания печени обработанных мышей в конце исследования. Статистическое сравнение с контрольной несущей средой DIO-GAN, определенное с помощью ANOVA с последующей поправкой в тесте Тьюки для множественных сравнений. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0057] На фиг. 44 показана экспрессия генов энергетического и липидного обмена в печени. Сравнение значений экспрессии генов между группами обработки соединением 1 с высоким и комбинированным уровнем для отдельных генов, участвующих в энергетическом и липидном обмене. Образцы печени обрабатывали для транскриптомического анализа с помощью RNAseq при завершении. Точки представляют собой средние значения кратности изменения экспрессии ($n=10$ мышей на группу) по сравнению с контрольной несущей средой DIO-GAN. Красный и синий цвета указывают направление изменения (красный=повышенная экспрессия; синий=сниженная экспрессия) между группами несущей среды DIO-GAN и нежирного контроля. Пунктирная линия указывает на идентичность. Сплошную линию получали с помощью линейного регрессионного анализа значений кратности изменения экспрессии для выбранных генов в группах обработки с высоким и комбинированным уровнем соединения 1. Выбранные гены участвовали в энергетическом и липидном обмене. Скваленэпоксидаза (Sqle), 7-дегидрохолестерин (Dhcr7), гидроксиметилглутерарил-КоА-синтаза (Hmgcs1) и стеароил-КоА-десатураза (Scd1).

[0058] На фиг. 45А, фиг. 45В, фиг. 45С и фиг. 45D показана экспрессия выбранных генов, участвующих в энергетическом и липидном метаболизме. Экспрессия в печени генов, участвующих в энергетическом и липидном обмене. Образцы печени обрабатывали для транскриптомического анализа с помощью RNAseq при завершении. Столбцы представляют собой средние значения (SD) экспрессии (FPKM) для выбранных генов, участвующих в энергетическом и липидном метаболизме. Скваленэпоксидаза (Sqle, фиг. 45А), 7-дегидрохолестерин (Dhcr7, фиг. 45В), гидроксиметилглутерарил-КоА-синтаза (Hmgcs1, фиг. 45С) и стеароил-КоА-десатураза (Scd1, фиг. 45D). Нежирный, белый цвет (крайний левый столбец); контроль несущей средой DIO-GAN, серый цвет (второй слева); соединение 2, синий цвет (третий слева); соединение 1 - низкий уровень, светло-оранжевый цвет (четвертый слева); соединение 1 - средний уровень, оранжевый цвет (пятый слева); соединение 1 - высокий уровень, темно-оранжевый цвет (четвертый справа); комбинир. - низкий уровень, светло-фиолетовый цвет (третий справа); комбинир. - средний уровень, фиолетовый цвет (второй справа); комбинир. - высокий уровень,

темно-фиолетовый цвет (самый правый стержень). Статистическое сравнение для отдельной группы обработки показано по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Группы комбинированной обработки дополнительно сравнивали с соединением 2 (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,0001$, ++++ $p < 0,00001$) или их соответствующими группами монотерапии соединением 1 (т.е., соединение 1 - низкий уровень по сравнению с комбинир. уровень - низкий уровень); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$, #### $p < 0,00001$.

[0059] На фиг. 46 показана экспрессия генов, участвующих в фиброзе и воспалении. Экспрессия генов, участвующих в фиброзе и воспалении, в печени. Образцы печени обрабатывали для транскриптомического анализа с помощью RNAseq при завершении. Столбцы представляют собой средние значения (SD) экспрессии (FPKM) для выбранных генов, участвующих в фиброзе и воспалении. Коллаген типа I альфа 1 (Colla1), гладкомышечный актин альфа 2 (Acta2), галектин 3 (Lgals3) и молекула адгезии клеток меланомы (CD146). Нежирный, белый цвет (крайний левый столбец); контроль несущей средой DIO-GAN, серый цвет (второй слева); соединение 2, синий цвет (третий слева); соединение 1 - низкий уровень, светло-оранжевый цвет (четвертый слева); соединение 1 - средний уровень, оранжевый цвет (пятый слева); соединение 1 - высокий уровень, темно-оранжевый цвет (четвертый справа); комбинир. - низкий уровень, светло-фиолетовый цвет (третий справа); комбинир. - средний уровень, фиолетовый цвет (второй справа); комбинир. - высокий уровень, темно-фиолетовый цвет (самый правый стержень). Статистическое сравнение для отдельной группы обработки показано по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0060]

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0061] При использовании в данном документе применяются следующие определения, если не указано иное. Кроме того, если какой-либо термин или символ, используемый в данном документе, не определен в соответствии со сформулированными ниже определениями, он имеет свое обычное значение, используемое в данной области техники.

[0062] Термин «содержащий» предназначен для обозначения того, что композиции и способы включают в себя перечисленные элементы, но не исключают других. Термин «состоящий по сути из» при использовании для определения композиций и способов означает исключение других элементов, имеющих какое-либо существенное значение для комбинации. Например, композиция, по сути состоящая из элементов, определенных в данном документе, не будет исключать других элементов, которые не оказывают материального эффекта на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявленного изобретения. Термин «состоящий из» означает исключение более чем следового количества, например, других ингредиентов и изложенных существенных стадий способа. Варианты осуществления, определяемые каждым из этих переходных терминов, входят в

объем настоящего изобретения.

[0063] Термин «комбинированная терапия» или «комбинированное лечение» относится к применению двух или более препаратов или средств в лечении, например, применение соединения 1, как используется в данном документе, вместе с другим средством, применимым для лечения нарушений печени, таких как NAFLD, NASH, а также симптомов и проявлений каждого из них, является комбинированной терапией. Введение в «комбинации» относится к введению двух средств (например, соединения 1, как используется в данном документе, и другого средства) любым способом, при котором фармакологические эффекты обоих проявляются у пациента одновременно. Таким образом, введение в комбинации не требует, чтобы одна фармацевтическая композиция, одна и та же лекарственная форма или даже один и тот же путь введения использовались для введения обоих средств или чтобы два средства вводились точно в одно и то же время. Оба средства также могут быть составлены в виде одной фармацевтически приемлемой композиции. Неограничивающим примером такой одной композиции является пероральная композиция или пероральная лекарственная форма. Например, и без ограничения, предполагается, что соединение 1 можно вводить в комбинации с другим средством в соответствии с настоящим изобретением.

[0064] Термин «вспомогательное вещество», используемый в данном документе, означает инертное или неактивное вещество, которое может быть использовано при производстве лекарственного средства или фармацевтического препарата, такого как таблетка, содержащая соединение по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента. Различные вещества могут быть охвачены термином вспомогательное вещество, включая без ограничения любое вещество, используемое в качестве связывающего вещества, разрыхлителя, покрытия, средства для прессования/инкапсуляции, крема или лосьона, смазывающего вещества, растворов для парентерального введения, материалов для жевательных таблеток, подсластителя или ароматизатора, суспендирующего/гелеобразующего средства или средства для влажной грануляции. Связывающие вещества включают в себя, например, карбомеры, повидон, ксантановую камедь и т.п.; покрытия включают в себя, например, ацетатфталат целлюлозы, этилцеллюлозу, геллановую камедь, мальтодекстрин, кишечнорастворимые покрытия и т.п.; вспомогательные средства для прессования/инкапсулирования включают в себя, например, карбонат кальция, декстрозу, фруктозу пп (пп - прямого прессования), мед пп, лактозу (ангидрат или моногидрат; необязательно в комбинации с аспартамом, целлюлозой или микрокристаллической целлюлозой), крахмал пп, сахарозу и т.п.; разрыхлители включают в себя, например, кроскармеллозу натрия, геллановую камедь, гликолят крахмала натрия и т.п.; кремы или лосьоны включают в себя, например, мальтодекстрин, каррагинаны и т.п.; смазывающие вещества включают в себя, например, стеарат магния, стеариновую кислоту, стеарилфумарат натрия и т.п.; материалы для жевательных таблеток включают в себя, например, декстрозу, фруктозу пп, лактозу (моногидрат, необязательно в комбинации с аспартамом или целлюлозой) и т.п.;

суспендирующие/гелеобразующие средства включают в себя, например, каррагинан, гликолят крахмала натрия, ксантановую камедь и т.п.; подсластители включают в себя, например, аспартам, декстрозу, фруктозу пп, сорбит, сахарозу пп и т.п.; и средства для влажной грануляции включают в себя, например, карбонат кальция, мальтодекстрин, микрокристаллическую целлюлозу и т.п.

[0065] Термин «пациент» относится к млекопитающим и включает в себя людей и отличных от человека млекопитающих. Примеры пациентов включают в себя без ограничения мышей, крыс, хомяков, морских свинок, свиней, кроликов, кошек, собак, коз, овец, коров и людей. В некоторых вариантах осуществления пациент относится к человеку.

[0066] Термин «фармацевтически приемлемый» означает безопасный и нетоксичный, предпочтительно для *in vivo* введения, более предпочтительно для введения человеку.

[0067] «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая является фармацевтически приемлемой. Соединение, описанное в данном документе, могут вводить в виде фармацевтически приемлемой соли.

[0068] «Соль» относится к ионному соединению, образованному между кислотой и основанием. Когда соединение, представленное в данном документе, содержит кислотную функциональную группу, такие соли включают в себя без ограничения соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов и аммониевые соли. Используемые в данном документе аммониевые соли включают в себя соли, содержащие протонированные азотистые основания и алкилированные азотистые основания. Иллюстративные и неограничивающие катионы, применимые в фармацевтически приемлемых солях, включают в себя Na, K, Rb, Cs, NH₄, Ca, Ba, имидазолиевые и аммониевые катионы на основе встречающихся в природе аминокислот. Когда соединения, используемые в данном документе, содержат основную функциональную группу, такие соли включают в себя без ограничения соли органических кислот, таких как карбоновые кислоты и сульфоновые кислоты, и соли минеральных кислот, таких как галогениды водорода, серная кислота, фосфорная кислота и т.п. Иллюстративные и неограничивающие анионы, применимые в фармацевтически приемлемых солях, включают в себя оксалат, малеат, ацетат, пропионат, сукцинат, тартрат, хлорид, сульфат, бисульфат, одно-, двух- и трехосновный фосфат, мезилат, тозилат и т.п.

[0069] «Терапевтически эффективное количество» или доза соединения или композиции относится к такому количеству соединения или композиции, которое приводит к уменьшению или ингибированию симптомов или продлению выживаемости у пациента. Результаты могут потребовать нескольких доз соединения или композиции.

[0070] Термины «лечение» или «осуществление лечения» относятся к подходу для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей данного изобретения полезные или желаемые результаты включают в себя без ограничения один или более из следующих эффектов: уменьшение одного или более

симптомов, вызванных заболеванием или нарушением; уменьшение степени заболевания или нарушения; стабилизация заболевания или нарушения (например, предупреждение или задержка ухудшения заболевания или нарушения); отсрочка возникновения или рецидива заболевания или нарушения; отсрочка или замедление прогрессирования заболевания или нарушения; улучшение состояния при заболевании или нарушении; обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания или нарушения; снижение дозы одного или более других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания или нарушения; усиление эффекта другого лекарственного средства, применяемого для лечения заболевания или нарушения; отсрочка прогрессирования заболевания или нарушения; повышение качества жизни и/или продление выживаемости пациента. Также под «лечением» понимается уменьшение патологических последствий заболевания или нарушения. Способы по настоящему изобретению предусматривают любой один или больше из этих аспектов лечения.

[0071] Используемый в данном документе термин «отсрочка» развития заболевания означает отложить, препятствовать, замедлить, затормозить, стабилизировать и/или задержать развитие заболевания, и/или замедлить прогрессирование или изменить процесс и/или курс основного заболевания, как только оно возникло. Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, который подлежит лечению. Как будет очевидно специалисту в данной области техники, достаточная или значительная задержка может по сути охватывать предупреждение, так что у индивидуума не будут развиваться клинические симптомы, ассоциированные с заболеванием. Способ, который «задерживает» развитие заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития заболевания в течение заданного периода времени и/или уменьшает степень заболевания в течение заданного периода времени при сравнении с неиспользованием этого способа, включая стабилизацию одного или большего количества симптомов, возникающих в результате заболевания.

[0072] Индивидуум, который «подвержен риску» развития заболевания, может иметь или не иметь выявляемое заболевание, а также может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание до применения способов лечения, описанных в данном документе. Термин «подвержен риску» означает, что у индивидуума имеется один или более так называемых факторов риска, которые представляют собой измеряемые параметры, которые коррелируют с развитием заболевания. Индивидуум, у которого присутствует один или более этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития заболевания, чем индивидуум, у которого эти факторы риска отсутствуют. Такие факторы риска включают в себя без ограничения возраст, пол, расовую принадлежность, рацион, наличие в анамнезе предшествующего заболевания, наличие заболевания-предвестника и генетические (т.е. наследственные) факторы. Соединения в некоторых вариантах осуществления могут вводиться субъекту (включая человека), который подвержен риску развития заболевания или состояния или в семейном анамнезе которого

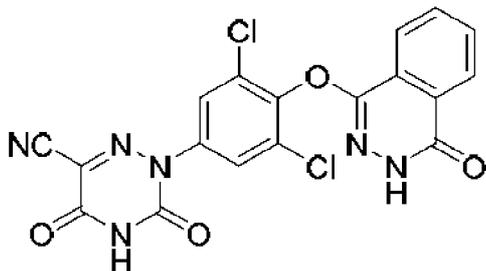
имеется это заболевание или состояние.

[0073] Термин «необязательный» или «необязательно», используемый во всем описании, означает, что описанное после него событие или обстоятельство может произойти, а может не произойти, и что описание включает в себя случаи, когда данное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит. Например, фраза «атом азота необязательно окислен для получения N-оксидных (N → O) фрагментов» означает, что атом азота может быть окислен, а может и не быть окислен, и что описание включает в себя ситуации, когда атом азота не окислен, и ситуации, когда атом азота окислен.

[0074] Используемый в данном документе термин «по сути такой, как показано в», когда речь идет, например, о паттерне XRPD, включает паттерн или график, который не обязательно идентичен тем, которые изображены в данном документе, но попадает в пределы экспериментальных ошибок или отклонений, если их рассматривает специалист в данной области техники.

Фармацевтически приемлемые композиции и составы

[075] Фармацевтически приемлемые композиции или просто «фармацевтические композиции» соединения 1, агониста бета-рецептора гормона щитовидной железы (THR-β),



Соединение 1

охвачены настоящим изобретением. Таким образом, настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль присоединения основания, такую как соль, образованную неорганическим или органическим основанием. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой калиевую соль соединения 1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль соединения 1. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут принимать форму, подходящую для перорального, буккального, парентерального, назального, местного или ректального введения, или форму, подходящую для введения путем ингаляции.

[0076] Соединение 1, подробно описанное в данном документе, может в одном аспекте находиться в очищенной форме, и композиции, содержащие соединение 1 в

очищенных формах, подробно описаны в данном документе. Представлены композиции, содержащие соединение 1, как подробно описано в данном документе, или его соль, такие как композиции по сути чистых соединений. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая соединение 1, как подробно описано в данном документе, или его соль, находится в по сути чистой форме. В одном варианте «по сути чистый» означает композицию, которая содержит не более 35% примеси, где примесь обозначает соединение, отличное от соединения, содержащего большую часть композиции или ее соли. Например, композиция по сути чистого соединения подразумевает композицию, которая содержит не более 35% примеси, где примесь обозначает соединение, отличное от соединения или его соли. В одном варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 25% примеси или не больше. В другом варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 20% примеси или не больше. В еще одном варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 10% примеси или не больше. В дополнительном варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 5% примеси или не больше. В другом варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 3% примеси или не больше. В еще одном варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит или не более 1% примеси. В дополнительном варианте представлена композиция по сути чистого соединения или его соли, где композиция содержит 0,5% примеси или не больше. В других вариантах осуществления композиция по сути чистого соединения означает, что композиция содержит не более 15% или предпочтительно не более 10% или более предпочтительно не более 5% или даже более предпочтительно не более 3% и наиболее предпочтительно не более 1% примеси.

[0077] В одном варианте соединение 1 представляет собой синтетическое соединение, полученное для введения индивидууму, такому как человек. В другом варианте представлены композиции, содержащие соединение 1 в по сути чистой форме. В другом варианте настоящее изобретение охватывает фармацевтические композиции, содержащие соединение 1 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В другом варианте представлены способы введения соединения 1. Очищенные формы, фармацевтические композиции и способы введения соединений являются подходящими для любого соединения или его формы, подробно описанных в данном документе.

[0078] Соединение 1 может быть составлено для любого доступного пути доставки, включая пероральную, мукозальную (например, назальную, сублингвальную, вагинальную, буккальную или ректальную), парентеральную (например, внутримышечную, подкожную или внутривенную), местную или трансдермальную доставку. Соединение 1 может быть составлено с подходящими носителями для обеспечения форм доставки, которые включают в себя, помимо прочего, таблетки,

каплеты, капсулы (такие как твердые желатиновые капсулы или мягкие эластичные желатиновые капсулы), облатки, пастилки, таблетки для рассасывания, жевательные резинки, дисперсии, суппозитории, мази, катаплазмы (припарки), пасты, порошки, повязки, кремы, растворы, пластыри, аэрозоли (например, назальные спреи или ингаляторы), гели, суспензии (например, водные или неводные жидкие суспензии, эмульсии масло-в-воде или жидкие эмульсии вода-в-масле), растворы и эликсиры.

[0079] Соединение 1 можно применять для получения состава, такого как фармацевтический состав, путем объединения соединения 1 в качестве активного ингредиента с фармацевтически приемлемым носителем, таким как упомянутые выше. В зависимости от терапевтической формы системы (например, трансдермальный пластырь в сравнении с пероральной таблеткой) носитель может находиться в различных формах. Кроме того, фармацевтические составы могут содержать консерванты, солюбилизаторы, стабилизаторы, повторно смачивающие средства, эмульгаторы, подсластители, красители, регуляторы и соли для регулировки осмотического давления, буферы, покрывающие средства или антиоксиданты. Составы, содержащие соединение 1, также могут содержать другие вещества, которые обладают ценными терапевтическими свойствами. Фармацевтические составы могут быть получены с помощью известных фармацевтических способов. Подходящие составы можно найти, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 21st ed. (2005), которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0080] Соединения, описанные в данном документе, можно вводить индивидуумам (например, человеку) в форме общепринятых пероральных композиций, таких как таблетки, покрытые оболочкой, и гелевые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, эмульсии или суспензии. Примерами носителей, которые могут быть использованы для получения таких композиций, являются микрокристаллическая целлюлоза, маннит, лактоза, кукурузный крахмал или его производные, тальк, стеарат или его соли и т.д. Приемлемыми носителями для гелевых капсул с мягкой оболочкой являются, например, растительные масла, воск, жиры, полутвердые и жидкие полиолы и т.д. Кроме того, фармацевтические составы могут содержать консерванты, солюбилизаторы, стабилизаторы, повторно смачивающие средства, эмульгаторы, подсластители, красители, регуляторы и соли для регулировки осмотического давления, буферы, покрывающие средства или антиоксиданты.

[0081] Соединение 1 имеет очень низкую растворимость в воде, даже при введении в форме соли. Калиевая соль соединения 1 имеет растворимость примерно 2,2 мкг/мл в буфере с pH 6,0 и растворимость примерно 8,0 мкг/мл в буфере с pH 8,0. Солюбилизаторы, такие как полоксамер 188, приводят к значительному разложению соединения 1. Было обнаружено, что конкретные ионные поверхностно-активные вещества, такие как лаурилсульфат натрия (SLS), совместимы с соединением 1 и могут быть составлены совместно с соединением 1 и его фармацевтически приемлемыми солями с минимальным разложением соединения или без него. Совместное составление

соединения 1 или его фармацевтических солей с ионными поверхностно-активными веществами (например, SLS) приводит к резкому повышению растворимости при всех уровнях pH.

[0082] В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и от приблизительно 1% по массе до приблизительно 10% по массе SLS. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и от приблизительно 1% по массе до приблизительно 8% по массе SLS. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и от приблизительно 1,5% по массе до приблизительно 8% по массе SLS. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и от приблизительно 1,5% по массе до приблизительно 5% по массе SLS. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и приблизительно 5% по массе SLS. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение калиевую соль соединения 1 и приблизительно 1,5% по массе лаурилсульфата натрия (SLS).

[0083] Другие потенциальные солубилизаторы, которые могут быть использованы в комбинации с соединением 1 или его фармацевтически приемлемой солью, включают докузат натрия, полисорбат, фосфолипид или D- α -токоферилполиэтиленгликольсукцинат (витамин E TPGS).

[0084] В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и лаурилсульфат натрия. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, лаурилсульфат натрия и кроскармеллозу натрия. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, лаурилсульфат натрия, кроскармеллозу натрия, коллоидный диоксид кремния и стеарат магния. В некоторых вариантах осуществления представлен состав, содержащий соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, лаурилсульфат натрия, кроскармеллозу натрия, коллоидный диоксид кремния, стеарат магния, капсулу гипромеллозы (HPMC), маннит и микрокристаллическую целлюлозу.

[0085] В некоторых вариантах осуществления представлено соединение 1, составленное в виде капсулы в любой лекарственной форме, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления представлен капсульный состав, содержащий от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 50 мг соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления представлен капсульный состав, содержащий приблизительно 0,5 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 25 мг или приблизительно

50 мг соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0086] В некоторых вариантах осуществления представлено соединение 1, составленное в капсуле с одним или более различными другими компонентами, представленными ниже в таблице А. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение 1, составленное в капсуле с одним или более различными другими компонентами в количествах, описанных ниже в таблице А.

Таблица А.

Компонент	Масса/мг	
Соединение 1	1,1-54,3	
Микрокристаллическая целлюлоза	59,3-177,9	
Маннит	29,6-88,8	
Лаурилсульфат натрия	5,0-15,0	
Кроскармеллоза натрия	3,0-9,0	
Коллоидный диоксид кремния	1,0-3,0	
Стеарат магния	1,0-3,0	
Капсула НРМС, размер 0	1 капсула	
Всего	100	300

[0087] В некоторых вариантах осуществления представлено соединение 1, составленное в форме таблетки в любой лекарственной форме, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления представлен таблетированный состав, содержащий от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 50 мг соединения 1. Следует понимать, что во всех вариантах осуществления масса соединения 1 относится к активной части молекулы (свободной кислоте). В вариантах осуществления, где используют форму соли соединения 1, массу соли корректируют для обеспечения того, чтобы соответствующее количество активного соединения находилось в композиции. В некоторых вариантах осуществления представлен таблетированный состав, содержащий приблизительно 0,5 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 25 мг или приблизительно 50 мг соединения 1.

[0088] Настоящее изобретение дополнительно охватывает наборы (например, фармацевтические упаковки). Предоставленный набор может содержать фармацевтические композиции или соединения, описанные в данном документе, и контейнеры (например, флаконы с лекарственным средством, ампулы, флаконы, шприцы и/или субпакеты или другие подходящие контейнеры).

Способы применения и варианты применения

[0089] Соединения и композиции, описанные в данном документе, могут в некоторых аспектах использоваться для лечения или предотвращения расстройств печени. В некоторых вариантах осуществления способ лечения или предупреждения заболевания

печени у пациента, нуждающегося в этом, включает введение пациенту соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0090] Нарушения печени включают без ограничения воспаление печени, фиброз и стеатогепатит. В некоторых вариантах осуществления нарушение печени выбрано из воспаления печени, фиброза печени, алкогольного фиброза, стеатоза, алкогольного стеатоза, первичного склерозирующего холангита (PSC), первичного билиарного цирроза (PBC), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH). В определенных вариантах осуществления нарушение печени выбрано из фиброза печени, алкогольного фиброза, стеатоза, алкогольного стеатоза, NAFLD и NASH. В одном варианте осуществления нарушение печени представляет собой NASH. В другом варианте осуществления нарушение печени представляет собой воспаление печени. В другом варианте осуществления нарушение печени представляет собой фиброз печени. В другом варианте осуществления нарушение печени представляет собой алкогольный фиброз. В другом варианте осуществления нарушение печени представляет собой стеатоз. В другом варианте осуществления нарушение печени представляет собой алкогольный стеатоз. В другом варианте осуществления заболевание печени представляет собой NAFLD. В одном варианте осуществления способы лечения, представленные в данном документе, препятствуют или замедляют прогрессирование NAFLD до NASH. В одном варианте осуществления способы лечения, представленные в данном документе, препятствуют или замедляют прогрессирование NASH. NASH может прогрессировать, например, до одного или более из цирроза печени, рака печени и т.д. В некоторых вариантах осуществления нарушение печени представляет собой NASH. В некоторых вариантах осуществления пациенту была сделана биопсия печени. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение результатов биопсии печени.

[0091] В некоторых вариантах осуществления представлен способ лечения нарушения печени у пациента, нуждающегося в этом, где заболевание печени выбрано из группы, состоящей из воспаления печени, фиброза печени, алкогольного фиброза, стеатоза, алкогольного стеатоза, первичного склерозирующего холангита (PSC), первичного билиарного цирроза (PBC), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH).

[0092] В данном документе представлены способы лечения или предупреждения нарушения печени у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в этом, с помощью соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, где нарушение печени выбрано из воспаления печени, фиброза печени, алкогольного фиброза, стеатоза, алкогольного стеатоза, первичного склерозирующего холангита (PSC), первичного билиарного цирроза (PBC), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH).

[0093] В данном документе также представлены способы ингибирования или

замедления прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) до неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в этом, включающие введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В данном документе также представлены способы ингибирования или замедления прогрессирования NASH у пациента (например, пациента-человека), нуждающегося в этом, включающие введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0094] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен способ уменьшения повреждения печени, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом, где фиброз уменьшается. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии одного или более маркеров фиброза снижается. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии Ccr2, Col1a1, Col1a2, Col1a3, Cxcr3, Dcn, Hgf, Il1a, Inhbe, Lox, Loxl1, Loxl2, Loxl3, Mmp2, Pdgfb, Plau, Serpine1, Perpnh1, Snai, Tgfb1, Tgfb3, Thbs1, Thbs2, Timp2 и/или Timp3 снижается. В некоторых вариантах осуществления уровень коллагена снижается. В некоторых вариантах осуществления уровень коллагеновых фрагментов снижается. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии маркера фиброза снижается в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 3 раза, в по меньшей мере 4 раза или в по меньшей мере 5 раз. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии маркера фиброза снижается в приблизительно 2 раза, в приблизительно 3 раза, в приблизительно 4 раза или в приблизительно 5 раз.

[0095] В некоторых вариантах осуществления представлен способ уменьшения повреждения печени, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом, где воспаление уменьшается. В некоторых один или более маркеров воспаления снижаются. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии Adgre1, Ccr2, Ccr5, Il1A и/или Il1r4 снижается. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии маркера воспаления снижается в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 3 раза, в по меньшей мере 4 раза или в по меньшей мере 5 раз. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии маркера фиброза снижается в приблизительно 2 раза, в приблизительно 3 раза, в приблизительно 4 раза или в приблизительно 5 раз.

[0096] У пациента могут быть повышены уровни щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы (GGT), аланинаминотрансферазы (ALT) и/или аспаратаминотрансферазы (AST). В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен способ уменьшения повреждения печени, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, где уровни GGT, ALT и/или

AST повышены до лечения. В некоторых вариантах осуществления уровень ALT у пациента в приблизительно 2-4 раза выше, чем верхняя граница нормальных уровней. В некоторых вариантах осуществления уровень AST у пациента в приблизительно 2-4 раза выше, чем верхняя граница нормальных уровней. В некоторых вариантах осуществления уровень GGT у пациента в приблизительно 1,5-3 раза выше, чем верхняя граница нормальных уровней. В некоторых вариантах осуществления уровень щелочной фосфатазы у пациента в приблизительно 1,5-3 раза выше, чем верхняя граница нормальных уровней. Способы определения уровней этих молекул хорошо известны. Нормальные уровни ALT в крови находятся в диапазоне приблизительно 7-56 единиц/литр. Нормальные уровни AST в крови находятся в диапазоне приблизительно 10-40 единиц/литр. Нормальные уровни GGT в крови находятся в диапазоне приблизительно 9-48 единиц/литр. Нормальные уровни щелочной фосфатазы в крови находятся в диапазоне приблизительно 53-128 единиц/литр для мужчины в возрасте от 20 до 50 лет и приблизительно 42-98 единиц/литр для женщины в возрасте от 20 до 50 лет.

[0097] Дефицит гормона щитовидной железы чаще встречается у пациентов с NAFLD и NASH (Pagadala MR, Zein CO, Dasarathy S, Yerian LM, Lopez R, McCullough AJ. Prevalence of hypothyroidism in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2012;57:528-34.). Щитовидная железа вырабатывает трийодтиронин (Т3) и тироксин (Т4) под контролем тиреотропина (тиреотропного гормона, [TSH]) из передней доли гипофиза в ответ на тиреотропин-рилизинг-гормон (TRH) из гипоталамуса. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, агонизм THR- β в печени участвует в снижении свободного Т4 без изменений Т3 или TSH, что может быть связано с модуляцией периферических гормонов щитовидной железы (Taub R, Chiang E, Chabot-Blanchet M, Kelly MJ, Reeves RA, Guertin MC, et al. Lipid lowering in healthy volunteers treated with multiple doses of MGL-3196, a liver-targeted thyroid hormone receptor- β agonist. *Atherosclerosis*. 2013;230:373-80.; Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol* 1990;4:743-748.). Признаки воздействия на центральную ось щитовидной железы могут представлять собой нежелательный эффект. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли не приводит к изменению уровней TSH, свободного Т3 или Т4 в сыворотке крови пациента до уровней, выходящих за пределы нормального диапазона.

[0098] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли не приводит к изменению сердечных биомаркеров пациента, включая СК, СК-МВ и тропонин I, до уровней, выходящих за пределы нормального диапазона.

[0099] Глобулин, связывающий половые гормоны (SHBG), вырабатывается в печени и связывает и стабилизирует половые гормоны, включая андрогены и эстрогены, влияя на общую и свободную фракции циркулирующих гормонов (Hammond 2016). Агонизм THR- β повышает экспрессию SHBG, что делает его пригодным маркером PD. В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически

приемлемой соли приводит к увеличению SHBG в сыворотке крови пациента. В некоторых вариантах осуществления повышение уровня SHBG в сыворотке крови пациента происходит в течение 4 дней после введения соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления SHBG в сыворотке крови пациента повышается на по меньшей мере 5% по сравнению с исходным уровнем после введения соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления SHBG в сыворотке крови пациента повышается на по меньшей мере 10% по сравнению с исходным уровнем после введения соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления SHBG в сыворотке крови пациента повышается на по меньшей мере 25% по сравнению с исходным уровнем после введения соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

[00100] В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек. Ожирение высоко коррелирует с NAFLD и NASH, но стройные люди также могут страдать NAFLD и NASH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления пациент страдает ожирением. В некоторых вариантах осуществления пациент не страдает ожирением. Ожирение может коррелировать с другими заболеваниями, такими как сахарный диабет или сердечно-сосудистые нарушения, или вызывать их. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления пациент также страдает сахарным диабетом и/или сердечно-сосудистым нарушением. Не ограничиваясь теорией, полагают, что сопутствующие заболевания, такие как ожирение, сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания, могут затруднить лечение NAFLD и NASH. И наоборот, единственным признанным в настоящее время методом лечения NAFLD и NASH является потеря веса, которая, вероятно, практически не повлияет на стройного пациента.

[00101] Риск NAFLD и NASH повышается с возрастом, но дети также могут страдать NAFLD и NASH, при этом в литературе сообщается о детях в возрасте от 2 лет (Schwimmer, et al., Pediatrics, 2006, 118:1388-1393). В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет 2-17 лет, например, 2-10, 2-6, 2-4, 4-15, 4-8, 6-15, 6-10, 8-17, 8-15, 8-12, 10-17 или 13-17 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет 18-64 года, например, 18-55, 18-40, 18-30, 18-26, 18-21, 21-64, 21-55, 21-40, 21-30, 21-26, 26-64, 26-55, 26-40, 26-30, 30-64, 30-55, 30-40, 40-64, 40-55 или 55-64 года. В некоторых вариантах осуществления возраст пациенте составляет 65 лет или больше, например, 70 лет или больше, 80 лет или больше или 90 лет или больше.

[00102] NAFLD и NASH являются распространенными причинами трансплантации печени, но у пациентов, которые уже получили один трансплантат печени, часто снова развивается NAFLD и/или NASH. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления пациент перенес трансплантацию печени.

[00103] В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии со способами, представленными в данном документе, приводит к снижению индекса активности NAFLD (NAS) у пациента. Например, в некоторых вариантах осуществления

стеатоз, воспаление и/или баллонирование уменьшаются при лечении. В некоторых вариантах осуществления способы лечения, представленные в данном документе, уменьшают фиброз печени. В некоторых вариантах осуществления способы снижают уровень триглицеридов в сыворотке крови. В некоторых вариантах осуществления способы снижают уровень триглицеридов в печени.

[00104] Дислипидемия, характеризующаяся повышенным уровнем холестерина и триглицеридов липопротеинов низкой плотности (LDL), является ключевым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*. 2013 March; 40(1):195-211.) и обычно наблюдается у пациентов с NASH (Loomba R. Nonalcoholic fatty liver progression rates to cirrhosis and progression of cirrhosis to decompensation and mortality: a real world analysis of Medicare data. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;51:1149-59.). Кроме того, дислипидемия является потенциальным патогенным фактором воспаления печени, лежащего в основе NASH (Walenbergh S. Cholesterol is a significant risk factor for nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015; 9:11:1343-46.). Аполипопротеин В (Аpo В) ассоциирован с холестерином LDL в крови и может быть пригоден при оценке липидного профиля пациента. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень Аpo В в сыворотке крови пациента. В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли приводит к снижению уровня Аpo В в сыворотке крови пациента в течение 4 дней после введения. В некоторых таких вариантах осуществления снижение уровня Аpo В в сыворотке крови пациента составляет по меньшей мере 5% по сравнению с исходным уровнем. В некоторых таких вариантах осуществления снижение уровня Аpo В в сыворотке крови пациента составляет по меньшей мере 10% по сравнению с исходным уровнем. В некоторых таких вариантах осуществления снижение уровня Аpo В в сыворотке крови пациента составляет по меньшей мере 15% по сравнению с исходным уровнем.

[00105] В некоторых вариантах осуществления указанный пациент подвержен риску развития нежелательного эффекта до введения в соответствии со способами, представленными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нежелательный эффект представляет собой нежелательный эффект, который влияет на почки, легкие, сердце и/или кожу. В некоторых вариантах осуществления нежелательным эффектом является зуд.

[00106] В некоторых вариантах осуществления пациент проходил одну или более предшествующих видов терапии. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени прогрессировало во время терапии. В некоторых вариантах осуществления пациент страдал от зуда во время по меньшей мере одной из одной или более предшествующих видов терапии.

[00107] На доклинических моделях на животных с соединением 1 было установлено, что площадь плазмы крови в равновесном состоянии под кривой с момента

времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) примерно 3320 нг*ч/мл была достаточной для обеспечения эффективности на основе различных фармакодинамических маркеров, как описано в примерах ниже. Экспозиция соединения 1 в количестве 3320 нг*ч/мл или более не приводит к нежелательным эффектам гормонов щитовидной железы, часто ассоциированным с агонизмом THR. Например, в исследованиях с однократным повышением дозы, описанных в примерах, $AUC_{0-\infty}$ соединения 1 в равновесном состоянии в плазме крови до примерно 50000 нг*ч/мл не приводила к каким-либо значительным побочным эффектам.

[00108] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 2500 нг*ч/мл до приблизительно 50000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 3000 нг*ч/мл до приблизительно 50000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 5000 нг*ч/мл до приблизительно 50000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 5000 нг*ч/мл до приблизительно 30000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 5000 нг*ч/мл до приблизительно 25000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 5000 нг*ч/мл до приблизительно 20000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 3000 нг*ч/мл до приблизительно 10000 нг*ч/мл. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят

ежедневно индивидууму, нуждающемуся в этом (например, пациенту с NASH), в дозе для получения площади в равновесном состоянии под кривой от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в плазме крови от приблизительно 5000 нг*ч/мл до приблизительно 10000 нг*ч/мл.

[00109] Неожиданно было обнаружено, что соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль могут достигать требуемой экспозиции при очень низких дозах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить пациентам перорально один раз в день в дозах от 1 мг или меньше и при этом в достаточной степени снижать активность аминоксидазы и снижать адгезию и трансмиграцию лимфоцитов. Например, соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 60 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 25 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 15 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе от приблизительно 2 мг до приблизительно 10 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 1 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 4 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 5 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 6 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 10 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 15 мг. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его

фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 20 мг. Следует понимать, что во всех вариантах осуществления масса соединения 1 относится к активной части молекулы (свободной кислоте). В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 30 мг. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально один раз в день пациенту с нарушением печени (например, NASH) в дозе приблизительно 60 мг. В вариантах осуществления, где используют форму соли соединения, массу соли корректируют для обеспечения того, чтобы соответствующее количество активного соединения находилось в композиции.

[00110] Период лечения обычно может составлять одну неделю или больше. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или больше. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет от приблизительно недели до приблизительно месяца, от приблизительно месяца до приблизительно года, от приблизительно года до приблизительно нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления период лечения составляет по меньшей мере любое из приблизительно 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или больше. В некоторых вариантах осуществления период лечения представляет собой оставшуюся продолжительность жизни пациента.

[00111] Введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли можно осуществлять один раз в день, два раза в день или один раз в два дня в течение периода лечения, составляющего одну или больше недель. В некоторых вариантах осуществления введение включает введение соединения ежедневно в течение периода лечения, составляющего одну или больше недель. В некоторых вариантах осуществления введение включает введение соединения два раза в день в течение периода лечения, составляющего одну или больше недель. В некоторых вариантах осуществления введение включает введение соединения один раз в два дня в течение периода лечения, составляющего одну или больше недель.

[00112] В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, вводимое в день 1 периода лечения, больше или равно количеству, вводимому во все последующие дни периода лечения. В некоторых вариантах осуществления количество, вводимое в день 1 периода лечения, равно

количеству, вводимому во все последующие дни периода лечения.

[00113] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли уменьшает стеатоз у индивидуума. Способы оценки стеатоза известны специалисту в данной области техники и могут включать гистологический анализ и присвоение гистологической оценки. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает снижение гистологических маркеров, ассоциированных со стеатозом.

[00114] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли уменьшает воспаление печени у индивидуума. Способы оценки воспаления печени известны специалисту в данной области техники и могут включать гистологический анализ и присвоение гистологической оценки лобулярного воспаления. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает уменьшение лобулярного воспаления или гистологических маркеров, ассоциированных с лобулярным воспалением.

[00115] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли уменьшает фиброз печени у индивидуума. Способы оценки фиброза печени известны специалисту в данной области техники и могут включать гистологический анализ. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает уменьшение фиброза или гистологических маркеров, ассоциированных с фиброзом.

[00116] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли уменьшает по меньшей мере один или по меньшей мере два из стеатоза, воспаления и фиброза печени у индивидуума. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как

воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает уменьшение по меньшей мере одного или по меньшей мере двух из стеатоза, лобулярного воспаления, фиброза или гистологических маркеров любого из вышеперечисленного.

[00117] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень триглицеридов в сыворотке крови у индивидуума. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает снижение уровня триглицеридов в сыворотке крови.

[00118] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень общего холестерина в сыворотке крови у индивидуума. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает снижение уровня холестерина в сыворотке крови.

[00119] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень аланинаминотрансферазы в сыворотке крови у индивидуума. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает снижение уровня аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.

[00120] В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень по меньшей мере одного или по меньшей мере двух триглицеридов в сыворотке крови, общего холестерина и аланинаминотрансферазы у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли снижает уровень триглицеридов в сыворотке крови, общего холестерина и аланинаминотрансферазы у индивидуума. Таким образом, следует понимать, что способы лечения, подробно

описанные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления включают лечение нарушения печени, такого как воспаление печени, фиброз печени, алкогольный фиброз, стеатоз, алкогольный стеатоз, первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный цирроз (PBC), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), у индивидуума, нуждающегося в этом, где лечение включает снижение уровня по меньшей мере одного или по меньшей мере двух триглицеридов в сыворотке крови, общего холестерина и аланинаминотрансферазы.

[00121] В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту, который не принимал пищу в течение по меньшей мере 10 часов до введения дозы. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту, который потреблял высококалорийную пищу с высоким содержанием жиров за менее чем 30 минут до введения дозы.

Полиморфы

[00122] В одном аспекте в данном документе представлен полиморф соединения 1 или его фармацевтически приемлемая соль. Полиморфы могут обладать такими свойствами, как биодоступность и стабильность при определенных условиях, которые подходят для медицинских или фармацевтических видов применения.

[00123] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен полиморфный тип А калиевой соли соединения 1. В некоторых вариантах осуществления тип А калиевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD по сути такой, как показан на фиг. 16. Углы 2-тета и относительные интенсивности пиков, которые могут наблюдаться для типа А калиевой соли соединения 1 с использованием XRPD, показаны в таблице В ниже.

Таблица В

Угол [°2θ]	Отн. инт. [%]
6,16	37,17
6,78	61,40
8,49	14,10
11,35	79,68
13,51	28,22
14,44	43,58
15,76	27,65
16,81	13,90
19,77	8,02
20,51	100,00
24,63	32,19
25,97	38,26

Угол [°2θ]	Отн. инт. [%]
26,68	15,27
29,13	42,93
31,00	6,24
31,75	10,08
34,09	9,97
35,67	16,95
36,47	8,52
37,74	10,88
38,90	10,20

[00124] В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А калиевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, отображающий по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять пиков при углах 2-тета с наибольшей интенсивностью в паттерне XRPD, как показано на фиг. 16 или как представлено в таблице В.

[00125] В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А калиевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$ и $20,51 \pm 0,20$ градуса. В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А калиевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$, $14,44 \pm 0,20$, $20,51 \pm 0,20$ и $29,13 \pm 0,20$ градуса. В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А калиевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $6,16 \pm 0,20$, $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$, $13,51 \pm 0,20$, $14,44 \pm 0,20$, $15,76 \pm 0,20$, $20,51 \pm 0,20$, $24,63 \pm 0,20$, $25,97 \pm 0,20$ и $29,13 \pm 0,20$ градуса.

[00126] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен полиморфный тип А натриевой соли соединения 1. В некоторых вариантах осуществления тип А натриевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, по сути такой, как показан на фиг. 18. Углы 2-тета и относительные интенсивности пиков, которые могут наблюдаться для типа А натриевой соли соединения 1 с использованием XRPD, показаны в таблице С ниже.

Таблица С

Пол. [°2θ]	Отн. инт. [%]
5,51	100,00
6,99	62,36
8,47	98,20
11,04	7,64
13,12	55,02

15,24	60,80
16,57	72,37
17,78	24,26
20,42	34,10
21,02	27,00
22,19	24,02
23,07	7,67
25,69	7,77
27,21	17,97
27,99	4,80
28,55	37,46
29,58	6,95
31,33	31,60
32,49	3,54
33,51	6,13
34,16	6,34

[00127] В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А натриевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, отображающий по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять или по меньшей мере десять пиков при углах 2-тета с наибольшей интенсивностью в паттерне XRPD, как показано на фиг. 18 или как представлено в таблице С.

[00128] В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А натриевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $5,51 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$ и $16,57 \pm 0,20$ градуса. В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А натриевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $5,51 \pm 0,20$, $6,99 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$, $15,24 \pm 0,20$ и $16,57 \pm 0,20$ градуса. В некоторых вариантах осуществления полиморфный тип А натриевой соли соединения 1 имеет паттерн XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $5,51 \pm 0,20$, $6,99 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$, $13,12 \pm 0,20$, $15,24 \pm 0,20$, $16,57 \pm 0,20$, $20,42 \pm 0,20$, $21,02 \pm 0,20$, $28,55 \pm 0,20$ и $31,33 \pm 0,20$ градуса.

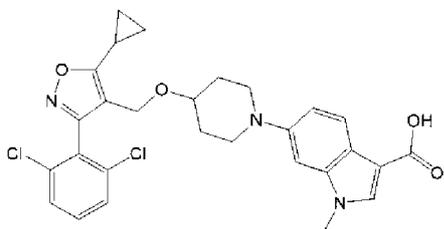
[00129] Следует понимать, что относительная интенсивность может варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая подготовку, размещение образца, а также прибор, аналитическую процедуру и настройки, используемые для получения спектра. Относительные интенсивности пика и распределение пиков могут варьироваться в пределах экспериментальной погрешности. В некоторых вариантах осуществления распределения пиков XRPD, перечисленные в данном документе, в том числе для полиморфного типа А калиевой соли соединения 1 или для полиморфного типа А

натриевой соли соединения 1, могут варьироваться на $\pm 0,6$ градуса, $\pm 0,4$ градуса, $\pm 0,2$ градуса или $\pm 0,1$ градуса 2-тета. В некоторых вариантах осуществления распределения пиков, перечисленные в данном документе, могут варьироваться на $\pm 0,6$ градуса 2-тета. В некоторых вариантах осуществления распределения пиков, перечисленные в данном документе, могут варьироваться на $\pm 0,4$ градуса 2-тета. В некоторых вариантах осуществления назначения пиков, перечисленные в данном документе, могут варьироваться на $\pm 0,2$ градуса 2-тета. В некоторых вариантах осуществления назначения пиков, перечисленные в данном документе, могут варьироваться на $\pm 0,1$ градуса 2-тета.

Комбинации

[00130] В настоящем изобретении дополнительно представлены комбинации соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли с другими терапевтическими средствами, которые применяют для лечения заболеваний печени. В частности, в настоящем изобретении представлены комбинации соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и других терапевтических средств, применяемых в лечении NASH. Благодаря своей низкой клинической дозе, как раскрыто в данном документе, соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для применения в комбинациях с фиксированной дозой для лечения NASH.

[00131] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с агонистом рецептора фарнезоида X (FXR). В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой обетихолевую кислоту. В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой цилофексор. В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой тропифексор. В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой EYP001 (Vonafexor, предлагаемый INN). В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой MET409 (метакрин). В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой EDP-305 (от Enanta). В некоторых вариантах осуществления агонист FXR представляет собой



(или «соединение 2») или его фармацевтически

приемлемую соль.

[00132] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с агонистом рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR). В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой пиоглитазон. В некоторых вариантах

осуществления агонист PPAR представляет собой росиглитазон. В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой элалафибранор. В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой сароглитазар. В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой ланифибранор. В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой элафибранор. В некоторых вариантах осуществления агонист PPAR представляет собой селаделфар.

[00133] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором всех видов каспазы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор всех видов каспазы представляет собой эмрикасан.

[00134] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором галектина-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор галектина-3 представляет собой белапектин.

[00135] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибитором стеароил Со-А десатуразы 1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор стеароил-Со-А десатуразы 1 представляет собой армахол.

[00136] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с антагонистом хемокинового рецептора типа 2 и 5 (хемокин CCR2/CCR5). В некоторых вариантах осуществления хемокиновый агонист CCR2/CCR5 представляет собой ценикривирок.

[00137] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с антиоксидантом. В некоторых вариантах осуществления антиоксидант представляет собой витамин E.

[00138] В некоторых вариантах осуществления соединение 1 вводят совместно с лекарственным средством, снижающим уровень холестерина. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство, снижающее уровень холестерина, представляет собой статин. В некоторых таких вариантах осуществления статином является аторвастатин, симвастатин или розувастатин.

Готовые изделия и наборы

[0139] В настоящем изобретении дополнительно представлены готовые изделия, содержащие соединение, описанное в данном документе, или его соль, композицию, описанную в данном документе, или одну или более стандартных доз, описанных в данном документе, в подходящей упаковке. В определенных вариантах осуществления изделие предназначено для применения в любом из способов, описанных в данном документе. Подходящая упаковка (например, контейнеры) известна в данной области техники и включает, например, флаконы, сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п. Изделие может быть дополнительно стерилизовано и/или герметизировано.

[0140] В настоящем изобретении дополнительно представлены наборы для осуществления способов по настоящему изобретению, которые содержат соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, или композицию, содержащую соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль. Наборы могут быть использованы для любого одного или более вариантов применения, описанных в данном документе, и соответственно могут содержать инструкции для лечения, как описано в данном документе.

[0141] Наборы обычно содержат подходящую упаковку. Наборы могут содержать один или более контейнеров, содержащих соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0142] Наборы могут находиться в единичных лекарственных формах, нерасфасованных упаковках (например, многодозовых упаковках) или субъединичных дозах. Например, могут быть представлены наборы, содержащие достаточные дозы соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и/или дополнительного фармацевтически активного соединения, применимого для лечения заболевания, подробно описанного в данном документе, для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода времени, такого как любое из недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или больше. Наборы могут также включать многократные разовые дозы соединения и инструкции по применению и быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и применения в аптеках (например, в аптеках при больницах и рецептурных аптеках).

[0143] Наборы могут необязательно содержать набор инструкций, как правило, письменных инструкций, хотя также приемлемы электронные носители информации (например, магнитная дискета или оптический диск), содержащие инструкции, относящиеся к использованию компонента(ов) способов по настоящему изобретению. Инструкции, прилагаемые к набору, обычно включают информацию о компонентах и их введении индивидууму.

Примеры

Пример 1. Исследование однократной возрастающей дозы соединения 1 у здоровых субъектов-людей

Способы

[0144] Проводили клиническое исследование с однократным повышением дозы соединения 1 (калиевая соль). Четыре группы из 8 здоровых участников рандомизировали для получения соединения 1 (3 мг, 10 мг, 30 мг или 60 мг в капсулах) или соответствующего плацебо в соотношении 3:1 (n=6 активных и n=2 плацебо), которые вводили натощак в день 1 исследования. Уровни соединения 1 и PD биомаркеры в плазме крови определяли до введения дозы и в различные временные точки после введения дозы.

[0145] Мониторинг нежелательных явлений (AE), рутинное клиническое лабораторное тестирование (включая тестирование оси щитовидной железы [свободный и

общий гормон щитовидной железы трийодтиронин (Т3), свободный и общий гормон щитовидной железы тироксин (Т4), тиреотропный гормон (ТSH)], сердечные биомаркеры [СК-МВ, тропонин I] и биохимический анализ печени), интенсивные показатели жизненно важных функций, телеметрию сердца и электрокардиограммы оценивали на протяжении всего исследования. Концентрации соединения 1 в плазме крови и моче определяли с использованием валидированного анализа методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

[0146] Образцы плазмы крови для определения концентрации соединения 1 и отбора образцов для РК исследования собирали до введения дозы и через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после введения однократной дозы исследуемого лекарственного препарата (плацебо или соединения). Образцы мочи для определения концентрации соединения 1 и отбора образцов для РК исследования собирали перед введением дозы и в следующие временные точки: 0-6 часов, 6-12 часов, 12-24 часа и 24-48 часов. РК параметры оценивали с помощью некомпартментных методов с использованием Phoenix[®] WinNonlin[®] (Certara, LP, Принстон, Нью-Джерси). Концентрации сывороточных фармакодинамических (PD) биомаркеров аполипопротеина В (Аpo В) и глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG), измеряли с помощью иммуноанализа, а липиды в сыворотке крови определяли с помощью спектрофотометрии.

[0147] Отбор PD образцов проводили до введения дозы и через 48 часов и 72 часа после введения дозы. Процент изменения от исходного уровня для PD маркеров рассчитывали с использованием модели ANCOVA с процентным изменением от исходного уровня в качестве зависимой переменной, группы лечения в качестве фиксированного эффекта и исходного уровня в качестве ковариаты. В анализах использовали только наблюдаемые данные без подстановки недостающих данных.

Результаты

Мониторинг нежелательных явлений, возникших в ходе лечения

[0148] Все нежелательные явления были легкой или умеренной степени тяжести и в значительной степени не связаны с исследуемым лекарственным средством. Не сообщалось о АЕ, связанных с сердечной деятельностью (например, тахикардия, аритмия), и не наблюдалось значительных изменений основных показателей жизнедеятельности или параметров ЭКГ (см. таблицу 1).

Таблица 1. Мониторинг безопасности при различных дозах соединения 1

	Плацебо (n=8)	3 мг соед. 2 (n=6)	10 мг соед. 2 (n=6)	30 мг соед. 2 (n=6)	60 мг соед. 2 (n=6)
Любые АЕ, все степени СТСАЕ	1 (12,5%)	2 (33,3%)	0	2 (33,3%)	0
СТСАЕ степени 1	0	0	0	1 (16,7%)	0
СТСАЕ степени 2	0	0	0	1 (16,7%)	0

СТСАЕ степени 3 или выше	0	0	0	0	0
Серьезные АЕ	0	0	0	0	0
АЕ в зависимости от отношения к лекарственному средству					
Не связано	1 (12,5%)	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)	0
Связь маловероятна	0	0	0	0	0
Связь возможна	0	0	0	1 (16,7%)*	0
Связано	0	0	0	0	0

*Один субъект сообщил о головной боли в день 1 и день 3, которая разрешилась спонтанно, и плевритной боли (левая подмышечная впадина) в день 2, которая длилась несколько часов и разрешилась после одной дозы (1000 мг) ацетаминофена.

Мониторинг безопасности и оси щитовидной железы

[0149] Частота сердечных сокращений оставалась стабильной и в пределах нормального диапазона в течение 24 часов после введения соединения 1, следуя аналогичной схеме, наблюдаемой в группе плацебо. Уровни TSH, свободного T3 и свободного T4 оставались в пределах нормы. Ни у одного субъекта не наблюдалось повышения уровня ALT в более чем 2 раза выше верхней границы нормы (ULN); ни у одного субъекта не наблюдалось уровней билирубина выше нормального диапазона. Кроме того, не наблюдалось заметных изменений в сердечных биомаркерах (тропонин I, СК-МВ) или других клинических тестах безопасности.

Фармакокинетика

[0150] Соединение 1 абсорбировалось с низкой вариабельностью (%CV \leq 33%) после введения натошак. Экспозиции (AUC, C_{max}) были примерно пропорциональными дозе. Медианный период полувыведения соединения 1 составлял от 13,8 до 17,3 ч, поддерживая дозировку один раз в день. Минимальную почечную экскрецию определяли при всех дозах. См. таблицу 2, фиг. 1, фиг. 2.

Таблица 2. Результаты фармакокинетики

Доза соединения 1	AUC _{inf} (ч*нг/мл)	C _{max} (нг/мл)	T _{max} (ч)	t _{1/2} (ч)	f _e (% дозы, моча)
3 мг (n=6)	4060 (16,6)	217 (13,9)	4,00 (3,00- 4,00)	17,3 (13,8- 20,1)	2,95 (62)
10 мг (n=6)	8110 (23,9)	614 (29,0)	4,00 (3,00- 4,03)	14,4 (11,5- 16,2)	2,05 (74)
30 мг (n=6)	33000	1800 (23,7)	4,00 (3,00-	15,7 (11,3-	1,78 (35)

	(33,0)		6,00)	23,1)	
60 мг (n=6)	50000 (31,4)	3300 (33,2)	4,00 (3,00- 4,00)	13,8 (10,5- 16,9)	1,53 (53)

Параметры представлены в виде 3 значимых цифр как среднее (%CV), за исключением T_{max} и $t_{1/2}$, которые представлены как медиана (диапазон min-max). f_e представляет собой долю дозы, выводимой с мочой в виде немодифицированного соединения 1.

Фармакодинамика

[0151] Средний процент изменения глобулина, связывающего половые гормоны (SHBG), и аполипопротеина В (Аро В) в день 3 после однократной дозы соединения 1 в день 1 исследования показан на фиг. 3 и фиг. 4 соответственно. Средний процент изменения относится к среднему значению наименьших квадратов (LSM) на основе модели ANCOVA и стандартной ошибки (SE). Р-значение по сравнению с плацебо: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$. Значимое повышение уровня SHBG наблюдали после однократных доз ≥ 10 мг соединения 1 по сравнению с плацебо. Дозозависимое снижение уровня LDL-с, общего холестерина и Аро-В наблюдали в день 3 после введения однократной дозы соединения 1 с аналогичными результатами в день 4. Значимых изменений уровней триглицеридов после однократной дозы соединения 1 не наблюдали (см. таблицу 3).

Таблица 3. Изменения PD маркеров, день 3

	Плацебо (РВО) (n=8)	3 мг (n=6)	10 мг (n=6)	30 мг (n=6)	60 мг (n=6)
SHBG					
Исходный уровень (нмоль/л)	35,0 (17,97)	46,7 (26,30)	55,0 (20,63)	26,0 (11,19)	39,3 (31,97)
Изменение (нмоль/л)	-0,77 (2,17)	0,20 (2,51)	15,8 (2,61)	6,0 (2,6)	5,05 (2,49)
% изменения на основе LSM	-3,8 (3,91)	6,3 (4,52)	31,3 (4,69)	16,5 (4,67)	13,8 (4,48)
Р-значение по сравнению с РВО	-	0,11	<0,0001	0,0023	0,0064
LDL-с					
Исходный уровень (нмоль/л)	106,1 (36,06)	137,5 (17,4)	133,7 (18,2)	123,3 (23,55)	125,2 (45,96)
Изменение (нмоль/л)	5,8 (3,44)	-3,98 (3,39)	0,68 (3,34)	-15,7 (3,32)	н.о.
% изменения на основе	5,6 (2,85)	-3,1	0,70	-12,5	н.о.

LSM		(2,80)	(2,76)	(2,75)	
P-значение по сравнению с PBO	-	0,048	0,24	0,0002	н.о.
HDL-с					
Исходный уровень (нмоль/л)	45,4 (11,40)	51,0 (22,53)	63,7 (23,55)	49,5 (7,82)	48,2 (13,93)
Изменение (нмоль/л)	0,29 (0,93)	0,87 (0,91)	-1,1 (0,96)	-6,1 (0,91)	н.о.
% изменения на основе LSM	1,7 (1,77)	2,4 (1,73)	-1,0 (1,83)	-12,1 (1,74)	н.о.
P-значение по сравнению с PBO	-	0,78	0,3027	<0,0001	н.о.
TC					
Исходный уровень (нмоль/л)	171,7 (45,05)	216,5 (29,87)	217,7 (38,10)	196,2 (31,2)	191,2 (51,68)
Изменение (нмоль/л)	2,3 (4,73)	-1,85 (4,59)	-1,93 (4,61)	-24,14 (4,52)	н.о.
% изменения на основе LSM	1,6 (2,15)	-0,88 (2,09)	-0,84 (2,09)	-11,84 (2,06)	н.о.
P-значение по сравнению с PBO	-	0,44	0,45	0,0002	н.о.
Apo B					
Исходный уровень (нмоль/л)	86,7 (23,18)	113,5 (20,06)	105,8 (9,26)	101,2 (15,89)	92,3 (24,9)
Изменение (нмоль/л)	3,8 (2,72)	-1,5 (3,14)	-5,6 (3,0)	-11,5 (2,97)	-13,9 (3,0)
% изменения на основе LSM	5,5 (2,63)	-2,7 (3,04)	-6,0 (2,91)	-11,0 (2,9)	-15,75 (2,91)
P-значение по сравнению с PBO	-	0,064	0,0081	0,0003	<0,0001

Выводы

[0152] Однократные возрастающие дозы соединения 1 до 60 мг были в целом безопасными и хорошо переносились и демонстрировали линейные и пропорциональные дозе экспозиции в плазме крови с низкой вариабельностью. Период полувыведения составлял >13 часов при всех уровнях однократной дозы, что свидетельствует в пользу

перорального введения дозы один раз в день. Почечная экскреция неизмененного соединения 1 была минимальной, что указывает на то, что почечная элиминация является незначительным путем.

[0153] Значимые дозозависимые эффекты на SHBG, Apo B и LDL-с наблюдали после однократной дозы соединения 1, что указывает на потенциал эффективности. По сравнению с эффективной дозой соединения 1 в доклинических моделях (пороговая AUC 3320 нг*ч/мл достигла значимого гистологического улучшения в мышинной модели NASH), достаточные уровни экспозиции достигали у субъектов-людей при всех дозах соединения 1.

[0154] Результаты по безопасности, PK и PD подтверждают продолжение разработки соединения 1 и указывают на то, что оно хорошо подходит для совместного составления с другими низкомолекулярными средствами для лечения NASH для перорального введения в виде комбинации с фиксированной дозой для перорального введения один раз в день.

Пример 2. Исследование многократных возрастающих доз соединения 1 у здоровых субъектов-людей

[0155] Проводили клиническое исследование с многократным повышением дозы соединения 1. Четыре группы из 8 здоровых участников рандомизировали для получения соединения 1 (1 мг, 3 мг, 6 мг или 10 мг в капсулах) или соответствующего плацебо в соотношении 3:1 (n=6 активных и n=2 плацебо), которые вводили один раз в день натощак в течение 14 дней. Уровни соединения 1 и PD биомаркеры в плазме крови определяли до введения дозы и в различные временные точки после введения дозы.

[0156] Мониторинг нежелательных явлений (AE) (таблица 4), рутинное клиническое лабораторное тестирование (включая тестирование оси щитовидной железы [свободный и общий гормон щитовидной железы трийодтиронин (Т3), свободный и общий гормон щитовидной железы тироксин (Т4), тиреотропный гормон (TSH)], сердечные биомаркеры [СК-МВ, тропонин I] и биохимический анализ печени) (фиг. 5, фиг. 6), интенсивные показатели жизненно важных функций, телеметрию сердца и электрокардиограммы оценивали на протяжении всего исследования. Концентрации соединения 1 определяли с использованием валидированного анализа методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

[0157] Образцы плазмы крови для определения концентрации соединения 1 и отбора образцов для PK анализа собирали перед введением дозы и через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после первой дозы, перед введением дозы в дни 3, 4, 5, 8, 11 и 13 введения дозы и перед введением дозы и через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после 14 дней однократного ежедневного введения исследуемого лекарственного препарата (плацебо или соединения). (см. таблицу 5, фиг. 7.) PK параметры оценивали с помощью некомпартментных методов с использованием Phoenix[®] WinNonlin[®] (Certara, LP, Принстон, Нью-Джерси). Концентрации сывороточных фармакодинамических (PD) биомаркеров аполипопротеина В (Apo B) и глобулина, связывающего половые гормоны

(SHBG), измеряли с помощью иммуноанализа, а липиды в сыворотке крови определяли с помощью спектрофотометрии.

[0158] Также проводили отбор образцов для PD анализа. Процент изменения от исходного уровня для PD маркеров рассчитывали с использованием модели ANCOVA с процентным изменением от исходного уровня в качестве зависимой переменной, группы лечения в качестве фиксированного эффекта и исходного уровня в качестве ковариаты. В анализах использовали только наблюдаемые данные без подстановки недостающих данных. Данные для PD анализа в день 15 исследования показаны на фиг. 8.

Результаты и выводы

Безопасность

Таблица 4. Безопасность и побочные эффекты

Частота возникновения АЕ у субъектов по категориям	Плацебо (N=6) n (%)	3 мг (N=6) n (%)	6 мг (N=6) n (%)	10 мг (N=6) n (%)
Любые АЕ, все степени СТСАЕ	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)
Степень 1	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)
Степень 2 или выше	0	0	0	0
Серьезные АЕ	0	0	0	0
АЕ в зависимости от отношения к лекарственному средству				
Не связано	0	1 (16,7%)	0	2 (33,3%)
Связь маловероятна	0	0	0	0
Связь возможна	0	0	1 (16,7%)	0
Связано	0	0	0	0

*Головокружение было зафиксировано у одного субъекта; СТСАЕ=общие терминологические критерии для нежелательных явлений, АЕ=нежелательные явления; нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (ТЕАЕ), представляют собой такие, которые возникают во время или после введения первой дозы исследуемого лекарственного средства; тяжесть нежелательных явлений оценивалась в соответствии с СТСАЕ версии 5.

Суточная доза плацебо или соединения 1 до 10 мг в течение 14 дней в целом хорошо переносилась. Критерии прекращения исследования или критерии прекращения повышения дозы не были удовлетворены. Все АЕ были степени тяжести 1 и большинство из них считались не связанными с исследуемым лекарственным средством. Все субъекты, рандомизированные в отношении соединения 1, завершили исследование без прекращения введения исследуемого лекарственного средства. Частота сердечных сокращений и артериальное давление оставались стабильными на протяжении всего исследования. Уровень свободного Т4 снижался дозозависимым образом без явных изменений TSH или свободного Т3; изменения Т4 были бессимптомными и не считались клинически значимыми, что свидетельствует о модуляции периферических гормонов

щитовидной железы, приводящей к снижению свободного Т4 без изменений Т3 или TSH.

[0159] Средние значения ALT были одинаковыми в разных группах и существенно не отличались от плацебо; ни у одного из пациентов, получавших лечение, не наблюдалось повышения уровня ALT до ≥ 2 x ULN. Было отмечено дозозависимое повышение уровня GGT, при этом значения оставались ниже ULN для пациентов, получавших лечение. Наблюдалось дозозависимое повышение уровня общего тестостерона, но никаких значимых изменений в свободных уровнях не выявляли.

[0160] Никаких заметных изменений в ЭКГ, сердечных биомаркерах или других клинических лабораторных тестах не выявляли.

Фармакокинетика и фармакодинамика

Таблица 5. Фармакокинетика

PK параметр в день 14	1 мг, QD	3 мг, QD N=6	6 мг, QD N=6	10 мг, QD N=6
AUC _{tau} (ч.нг/мл) (среднее, % CV)	1090 (15,7)	3600 (26,9)	8310 (44,4)	10600 (21,1)
C _{max} (нг/мл) (среднее, %CV)	80,3 (20,0)	291 (30,9)	699 (35,1)	996 (18,0)
C _{tau} (нг/мл) (среднее, %CV)	25,7 (28,6)	77,9 (37,6)	175 (64,7)	196 (38,0)
t _{1/2} (ч) (медиана, min-max)	19,5 (17,0-23,8)	16,0 (14,1-19,6)	15,8 (12,7-17,6)	15,4 (13,1-18,5)

[0161] Фармакокинетические данные указывали на хорошую пероральную биодоступность с низкой PK вариабельностью. Многократные дозы соединения 1 приводили к значимому и дозозависимому повышению уровня SHBG даже при низкой дозе 3 мг QD. Снижение уровня общего холестерина, LDL-с, Apo B и триглицеридов наблюдали при всех уровнях дозы соединения 1, при этом значимые снижения наблюдали в день 15 в когорте, получавшей дозу 10 мг. Уровень HDL-с значимо не менялся к дня 15. Эти результаты подтверждают, что низкая однократная суточная доза соединения 1 является эффективной.

Пример 3. Исследования лекарственных взаимодействий с соединением 1 у здоровых людей

[0162] Исследования in vitro показали, что соединение 1 обладает потенциалом для ингибирования первого прохождения полипептидов, транспортирующих органические анионы (OATP) 1B1/1B3, и кишечного ингибирования транспортеров белка устойчивости к раку молочной железы (BCRP) (IC₅₀ OATP1B1 =2,01 микромоля; IC₅₀ OATP1B3 =0,71 микромоля; IC₅₀ BCRP =9,37 микромоля). Влияние соединения 1 на фармакокинетику совместно вводимого розувастатина (ROS), антигиперлипидемического лекарственного средства и субстрата OATP и BCRP у здоровых участников определяли путем введения соединения 1 и ROS, как описано в таблице 6, в комбинации с отбором образцов для PK

анализа.

Таблица 6. Совместное введение соединения 1 с розувастатином (ROS)

День исследования	1	2	3-8	9	10-11	12
Когорта 1 (n=10)	Однократная доза 10 мг ROS PO	Без лечения	До 90 мг соединения 1, QD PO	Однократная доза до 90 мг Соединение 1+однократная доза 10 мг ROS PO	Без лечения	Выписка из клиники

PO=перорально; QD=один раз в день

[0163] Кроме того, соединение 2 представляет собой ингибитор экспрессируемых в кишечнике транспортеров Р-гликопротеина (P-gp) и BCRP (IC₅₀ P-gp =3,92 микромоля; IC₅₀ BCRP =4,39 микромоля). Основываясь на исследованиях in vitro, ингибирование этих транспортеров соединением 2 может увеличить абсорбцию совместно вводимого соединения 1. Таким образом, проводят исследование лекарственных взаимодействий (DDI) для оценки способности соединения 2 усиливать абсорбцию соединения 1 посредством ингибирования кишечного P-gp и BCRP, как описано в таблице 7.

Таблица 7. Совместное введение соединения 1 и соединения 2

День исследования	1	2-6	7-12	13	14-16	17
Когорта 2	Однократная доза до 90 мг соединения 1 PO	Без лечения	15 мг соединения 2 QD PO	Однократная доза до 90 мг соединения 1+однократная доза 15 мг соединения 2	Без лечения	Выписка из клиники

Пример 4. Влияние пищи на соединение 1 у здоровых людей

[0164] Влияние пищи на поглощение и фармакокинетику соединения 1 у здоровых участников определяют путем введения соединения 1 во время приема пищи и натощак, как описано в таблице 8, в комбинации с отбором образцов для РК анализа.

Таблица 8. Исследования влияния пищи

Период исследования/день исследования	Период 1/день 1	Дни 2-8	Период 2/день 9	Дни 10-11	День 12
Когорта 3	До 90 мг	Вымывание	До 90 мг	Без	Выписка

Последовательность А (n=4)	соединения 1 РО (натошак)		соединения 1 (с пищей)	лечения	из клиники
Когорта 3, последовательность В (n=4)	До 90 мг соединения 1 РО (с пищей)	Вымывание	До 90 мг соединения 1 РО (натошак)	Без лечения	Выписка из клиники

[0165] Участники голодают в течение ночи (без пищи или жидкостей, кроме воды, в течение по меньшей мере 10 часов до введения дозы). В день 9 в последовательности А и в день 1 в последовательности В за 30 минут до введения исследуемого лекарственного средства обеспечивают высокожирный/высококалорийный завтрак, содержащий ~1000 ккал и от 45% до 55% жира. Исследуемое лекарственное средство вводят во время завтрака или в течение 5 минут после его завершения участниками (100% потребление).

[0166] Мониторинг безопасности по оси щитовидной железы и мониторинг безопасности сердечно-сосудистой системы проводят, как описано в предыдущих примерах.

Пример 5. Влияние соединения 1 в мышинной модели NASH

[0167] Мышам C57BL/6J скармливали диету с высоким содержанием жиров в течение 10 недель, чтобы вызвать ожирение (>38 г BW). Мышам с ожирением вводили внутривентриально (i.p.) два раза в неделю в течение четырех недель 0,5 мкл/г 25% CCl₄ (составленный в оливковом масле) для индуцирования фиброза, а одной группе мышей с нормальной BW вводили i.p. два раза в неделю в течение четырех недель оливковое масло в качестве нормального контроля. В течение того же периода введения дозы мышам с ожирением скармливали перорально один раз в день в течение 28 дней несущую среду или различные дозы соединения 1. В дни введения дозы CCl₄ вводили CCl₄ через 4 часа после введения соединения или несущей среды. В день 27 все животные голодали в течение приблизительно 16 часов до терминальной эвтаназии. В день 28 всех животных умерщвляли и анализировали различные биологические параметры. Измеряли общую массу тела, печени, сердца и головного мозга и нормализовали изменения массы печени и сердца с использованием массы головного мозга.

[0168] Соединение 1 значительно снижало массу печени/головного мозга без влияния на общую массу тела или массу сердца/головного мозга (фиг. 9). Гистологический анализ ткани печени осуществляли для обнаружения влияния соединения 1 на стеатоз, воспаление и фиброз. Соединение 1 значительно уменьшало стеатоз при всех тестируемых дозах, демонстрировало тенденцию к уменьшению воспаления и значительно уменьшало фиброз печени при 3 и 10 мг/кг (фиг. 10). Соединение 1 также значительно снижало уровень общего холестерина, триглицеридов и ALT в сыворотке крови при всех тестируемых дозах (фиг. 11).

[0169] Образцы печени собирали для анализа всего транскриптома с помощью

секвенирования РНК (RNAseq). Получение и секвенирование библиотеки RNAseq (n=5 на группу) проводили с использованием стандартных протоколов Illumina. Выравнивание считываний секвенирования выполняли с использованием программного обеспечения для выравнивания STAR, а количество считываний оценивали с использованием RSEM. Дифференциально экспрессируемые гены (по сравнению с контрольными мышами с NASH, обработанными носителем) определяли с использованием программного обеспечения EdgeR. Онтологический анализ генов проводили с использованием программного обеспечения Advaita с кратным изменением и скорректированными пороговыми р-значениями >1,5 и <0,05 соответственно. Онтологии генов получали из базы данных Gene Ontology Consortium (2019-Apr26) (Ashburner et al., Gene ontology: Tool for the unification of biology. Nature Genetics 25(1): 25-9 (2000); Gene Ontology Consortium, Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. Genome Research 11: 1425-1433 (2001)). Соединение 1 оказывало значимое влияние на экспрессию генов, ассоциированных с активацией внеклеточного коллагенового матрикса и звездчатых клеток печени, главным образом за счет снижения их уровней экспрессии по сравнению с контрольными мышами NASH (фиг. 12).

Пример 6. Влияние pH и солилизатора на растворимость соединения 1

[0170] Растворимость соединения 1 (калиевая соль) оценивали при различных уровнях pH. Растворимость соединения 1 в водном растворе зависела от уровня pH и увеличивалась с увеличением уровня pH, как показано в таблице 9. В присутствии солилизатора (лаурилсульфат натрия, SLS) растворимость соединения 1 дополнительно улучшилась до 308 мкг/мл в буфере с pH 10,0+2 масс.% SLS при 25 °C через 24 ч.

Таблица 9. Влияние уровня pH и солилизатора на растворимость соединения 1. (Примерное значение pKa соединения 1=4,12.)

Растворитель	Растворимость (мкг/мл)	
	24 ч (без 2 масс.% SLS)	24 ч (с 2 масс.% SLS)
0,1 н. HCl	<0,03	5,7
буфер с уровнем pH 2,0	<0,07	5,5
буфер с уровнем pH 4,0	<0,07	10,0
буфер с уровнем pH 6,0	2,2	42,3
буфер с уровнем pH 8,0	10,8	301,9
буфер с уровнем pH 10,0	10,2	308,2

Пример 7. Составы соединения 1, фармакокинетика, эффект пищи у собак породы бигль

[0171] Для определения влияния солилизатора (SLS) на поглощение соединения 1 50 мг (на основе свободной кислоты) соединения 1 составляли в капсуле с 5 масс. % SLS или без него (см. таблицу 10) и вводили собакам породы бигль натошак, предварительно обработанным пентагастрином (6 мкг/кг, вводили путем внутримышечной инъекции за 30 ±2 минуты до введения соединения 1). Концентрацию соединения 1 в плазме крови

измеряли в течение 24 часов (см. фиг. 13). Состав с 5% масс. SLS повышал экспозицию (C_{\max} , AUC) соединения 1 на более чем 70% (см. таблицу 11).

Таблица 10. Композиция капсульных составов 50 мг соединения 1.

	Состав 1 (PO1) (масс.%)	Состав 2 (PO2) (масс.%)
Соединение 1	18,25	18,25
Микрокристаллическая целлюлоза PH-102	51,16	47,83
Маннит 200SD	25,58	23,92
Лаурилсульфат натрия SLS мелкодисперсный	0	5,0
Кроскармеллоза натрия	3,0	3,0
Коллоидный диоксид кремния Aerosil 200 Pharma	1,0	1,0
Магния стеарат LIGAMED MF-2-V	1,0	1,0

Таблица 11. Фармакокинетика соединения 1 после введения дозы капсул 50 мг у собак породы бигль (n=5).

	Состав 1	Состав 2
C_{\max} (нг/мл)	572	1010
T_{\max} (ч)	3,60	3,20
$t_{1/2}$ (ч)	4,46	4,11
AUC _{0-last} (нг*ч/мл)	3420	6210
AUC _{0-inf} (нг*ч/мл)	3700	6360

[0172] Для определения влияния уровня pH на PK параметры собак породы бигль разделяли на две группы (n=3 на группу). Для группы 1 собак предварительно обрабатывали пентагастрином (6 мкг/кг, внутримышечная инъекция за 30±2 минуты до введения соединения 1). Для группы 2 собак предварительно обрабатывали фамотидином (2 таблетки, 20 мг/таблетка, пероральное введение за 180 ±10 минут до введения соединения 1). Вводили соединение 1 (капсула 10 мг, 5% SLS), и концентрации соединения 1 в плазме крови контролировали в течение 24 часов, и они изображены на фиг. 14. Минимальный эффект уровня pH наблюдали у собак в условиях исследования.

[0173] Чтобы определить влияние пищи на PK параметры, собак породы бигль разделяли на две группы (n=3 на группу). В группе, подвергавшейся голоданию, собак подвергали голоду в течение 4 часов после введения дозы. Для группы, получавшей пищу, собак кормили пищей с высоким содержанием жиров за 30 минут до введения. Концентрации соединения 1 в плазме крови контролировали в течение 24 ч. Вводили соединение 1 (капсула 10 мг, 5% SLS) и концентрации соединения 1 в плазме крови

контролировали в течение 24 ч, и они изображены на фиг. 15. Введение пищи задерживало T_{\max} соединения 1, но не влияло на экспозицию в плазме крови.

Пример 8. Получение калиевой соли соединения 1

[0174] Этил (Е)-(2-циано-2-(2-(3,5-дихлор-4-((4-оксо-3,4-дигидрофталазин-1-ил)окси)фенил)гидразинилиден)ацетил)карбамат (7,4 кг, 0,99-1,01X), ацетат калия (7,4 кг, 0,95-1,00X) и DMAc (41 кг, 5,6-6,0X) загружали в реактор GL объемом 500 л. Полученную смесь выдерживали при 80-90°C в течение 12-16 ч. Смесь доводили до 20-30°C. Раствор Koh (0,85 кг, 0,11-0,17X) в технологической воде (8 кг, 1,0-1,5X) добавляли при 20-30°C в течение 1-2 ч. Смесь перемешивали при 20-30°C в течение 1-2 ч. Добавляли технологическую воду (39 кг, 5,0-5,5X) при 20-30°C в течение 4-6 ч. Смесь перемешивали при 20-30°C в течение 2-3 ч. Полученную смесь центрифугировали с помощью центрифуги из нержавеющей стали. Влажный осадок дважды промывали технологической водой (18+20 кг, 2-3X). Загрузили влажный осадок и технологическую воду (38 кг, 5,0-6,0X) в реактор GL объемом 500 л. Смесь перемешивали при 20-30°C в течение 2-3 ч. Полученную смесь центрифугировали с помощью центрифуги из нержавеющей стали. Влажный осадок дважды промывали технологической водой (18+22 кг, 2-3X) и сушили в сушилке из нержавеющей стали при пониженном давлении при 55-65°C с получением неочищенной калиевой соли соединения 1 (5,45 кг, чистота: 98,4%; количественное содержание: 95,9%; выход: 72%).

[0175] Неочищенную калиевую соль соединения 1 (5,3 кг, 0,99-1,01X) и DMSO (43 кг, 6,0-8,0X) загружали в реактор 250 GL (R1). Полученную смесь выдерживали при 40-50°C в течение 0,5-1 ч с получением прозрачного раствора. Добавляли этилацетат (EA) (22 кг, 4,0-4,5X) при 40-50°C в течение 1-2 ч. Полученную смесь фильтровали через встроенный фильтр и переносили в реактор 250 GL (R2). R1 промывали DMSO (1,8 кг, 0,2-0,5X), и материал фильтровали через встроенный фильтр и переносили в R2. Доводили до 40-50°C и загружали EA (22 кг, 4,0-4,5X) в R2 при 40-50°C в течение 1-2 ч. Загружали затравки соединения 1 (0,010 кг, 0,001-0,002X) в R2. Полученную смесь перемешивали при 40-50°C в течение 1-2 ч. Загружали EA (67 кг, 12,0-13,0X) в R2 при 40-50°C в течение 12-15 ч и перемешивали при 40-50°C в течение 2-3 ч. Отбирали образцы для анализа (описание: XRPD влажного осадка: соответствует эталонной форме А). Загружали EA (27 кг, 1,0-5,0X) в R2 при 40-50°C в течение 2 ч и перемешивали при 40-50°C в течение 2-3 ч. Доводили R2 до 20-30°C в течение 2 ч и перемешивали при 20-30°C в течение 4-6 ч. Полученную смесь фильтровали в фильтровальной сушилке из нержавеющей стали. Влажный осадок дважды промывали EA (16+14 кг, 2-3X). Загружали EA (36 кг, 6-7X) в фильтр-осушитель из нержавеющей стали. Доводили до 20-30°C и перемешивали при 20-30°C в течение 2-3 ч. Полученную смесь фильтровали в фильтровальной сушилке из нержавеющей стали. Влажный осадок промывали EA (16 кг, 2-3X) и сушили в фильтровальной сушилке из нержавеющей стали при пониженном давлении при 60-70°C. Материал просеивали с получением очищенной калиевой соли соединения 1 (4,16 кг, чистота: 99,81%; анализ: 97,6%; выход: 80%). См. фиг. 16.

Пример 9. Исследование скрининга соли для соединения 1

[0176] Несколько форм соли соединения 1 оценивали на основе их свойств (включая растворимость, стабильность и гигроскопичность) по сравнению с формой калиевой соли, полученной в примере 8 (см. фиг. 16, таблица 12).

Таблица 12. Перечень пиков: (форма А калиевой соли соединения 1)

Пол. [°2 θ]	Высота [имп.]	FWHM слева [°2 θ]	d-расстояние [Å]	Отн. инт. [%]
6,16	320,90	0,1023	14,34	37,17
6,78	530,15	0,1023	13,04	61,40
8,49	121,75	0,1023	10,41	14,10
11,35	687,96	0,1023	7,79	79,68
13,51	243,61	0,1279	6,56	28,22
14,44	376,23	0,1279	6,13	43,58
15,76	238,73	0,1279	5,62	27,65
16,81	119,97	0,2047	5,27	13,90
19,77	69,22	0,2047	4,49	8,02
20,51	863,38	0,1535	4,33	100,00
24,63	277,93	0,1279	3,61	32,19
25,97	330,30	0,1279	3,43	38,26
26,68	131,82	0,1535	3,34	15,27
29,13	370,67	0,1791	3,07	42,93
31,00	53,89	0,3070	2,88	6,24
31,75	87,04	0,1535	2,82	10,08
34,09	86,07	0,1535	2,63	9,97
35,67	146,38	0,2047	2,52	16,95
36,47	73,59	0,2047	2,46	8,52
37,74	93,93	0,1535	2,38	10,88
38,90	88,02	0,2047	2,32	10,20

[0177] Используя форму свободной кислоты А (фиг. 17) в качестве исходного материала, в общей сложности проводили 50 экспериментов по солевому скринингу с 10 солеобразователями и 5 растворителями. Результаты характеристики показали, что в общей сложности 14 солей получали в экспериментах по солевому скринингу и повторному приготовлению, включая соль аммония типа В/CN1, соль L-лизина типа А/В/С, соль магния типа А, соль холина типа А, соль кальция типа А, соль L-аргинина типа А/В, соль натрия типа А, соль Tris типа А/В, соль диэтиламина типа А и 4 формы свободной кислоты, включая свободную кислоту типа А/В/С/Д.

[0178] На основании данных характеристики (с использованием хорошей кристалличности, точного сигнала DSC, целочисленного молярного соотношения, высокого класса безопасности и простого полиморфизма в качестве критериев), соль натрия типа А (фиг. 18, таблица 13), соль L-аргинина типа А (фиг. 19) и соль магния типа А (фиг. 20) были выбраны для повторного приготовления и оценки кинетической растворимости, при этом калиевую соль использовали в качестве эталона при сравнении. Результаты оценки растворимости показали, что натриевая соль продемонстрировала самую высокую растворимость в воде при комнатной температуре в течение 24 часов (~0,4 мг/мл, аналогично растворимости калиевой соли в воде при 37 °С). В моделируемой желудочной жидкости (SGF) при 37 °С калиевая соль продемонстрировала наиболее высокую растворимость (0,11 мг/мл), за которой следовала натриевая соль. В моделируемой кишечной жидкости натощак (FaSSIF) при 37 °С магниевая соль продемонстрировала наиболее высокую растворимость (~0,04 мг/мл), за которой следовала свободная кислота. В моделируемой кишечной жидкости после приема пищи (FeSSIF) при 37 °С аналогичную растворимость (~0,02 мг/мл) наблюдали в четырех солях и свободной кислоте. Результаты XRPD показали, что, за исключением свободной кислоты, изменения формы наблюдали во всех солях в разных тестируемых средах.

Таблица 13. Перечень пиков (форма А натриевой соли соединения 1)

Пол. [°2θ]	Высота [имп.]	FWHM слева [°2θ]	d-расстояние [Å]	Отн. инт. [%]
5,51	1473,10	0,1279	16,02	100,00
6,99	918,64	0,1535	12,64	62,36
8,47	1446,52	0,1023	10,44	98,20
11,04	112,50	0,1535	8,01	7,64
13,12	810,51	0,1791	6,75	55,02
15,24	895,67	0,1535	5,82	60,80
16,57	1066,13	0,1279	5,35	72,37
17,78	357,33	0,1023	4,99	24,26
20,42	502,33	0,1279	4,35	34,10
21,02	397,74	0,1791	4,23	27,00
22,19	353,84	0,1023	4,01	24,02
23,07	113,00	0,1535	3,86	7,67
25,69	114,50	0,2303	3,47	7,77
27,21	264,78	0,1023	3,28	17,97
27,99	70,75	0,8187	3,19	4,80
28,55	551,84	0,2047	3,13	37,46
29,58	102,40	0,1535	3,02	6,95

31,33	465,57	0,1535	2,86	31,60
32,49	52,21	0,2047	2,76	3,54
33,51	90,30	0,2047	2,67	6,13
34,16	93,36	0,1535	2,62	6,34

[0179] В соответствии с результатами оценки кинетической растворимости, с более высокой растворимостью (по сравнению со свободной кислотой) и простым полиморфизмом в качестве критериев, безводную натриевую соль типа А выбирали в качестве кандидата для оценки физико-химической стабильности, гигроскопичности и испытаний PLM и сравнивали с калиевой солью типа А (таблица 14). Результаты этих тестов показали:

1) Оценка физико-химической стабильности: после хранения при 60 °С/герметично и 60 °С/75% отн.вл. в течение 1 и 2 недель для натриевой соли типа А наблюдали незначительное снижение чистоты на основе ВЭЖХ (<0,1% площади) и отсутствие изменения формы.

2) Гигроскопичность: результаты динамической сорбции паров (DVS) показали, что натриевая соль типа А была слегка гигроскопичной без изменения формы после испытания DVS.

3) PLM: образец натриевой соли типа А состоял из неправильных кристаллов с размером частиц <20 мкм. Характеристика и сравнение данных оценки натриевой соли и калиевой соли представлены в таблице 14.

Таблица 14. Обобщенные данные по характеристике натриевой соли и калиевой соли

Кристаллическая форма Свойства	Калиевая соль типа А	Натриевая соль типа А
Кристалличность	Высокая	Высокая
Потеря TGA	2,1% (до 300 °С)	1,6% (до 180 °С)
Эндотермический сигнал DSC, °С (пик)	--	110,9 [#]
Чистота на основе ВЭЖХ, % площади	99,95	99,72
Молярное соотношение (API/образователь)	1:1	1:1
Предполагаемая форма	Ангидрат	Ангидрат
Кинетическая растворимость	Растворимость в воде и SGF при 37 °С была выше, чем в FaSSIF/FeSSIF при 37 °С, до ~0,37 мг/мл (концентрация	Растворимость в воде при к.т. была выше, чем в SGF/FaSSIF/FeSSIF при 37°С, до ~0,36 мг/мл

Кристаллическая форма Свойства	Калиевая соль типа А	Натриевая соль типа А
	свободной кислоты).	(концентрация свободной кислоты).
Гигроскопичность/поглощение воды при 80% отн.вл./изменение формы после DVS	Негигроскопичная/ 0,08%/нет	Слегка гигроскопичная/ 0,9%/нет
Физико-химическая стабильность	После хранения при 60 °С/герметично и 60 °С/75% отн.вл. в течение одной и двух недель наблюдали незначительное снижение чистоты на основе ВЭЖХ (<0,1% площади) и отсутствие изменения формы	

--: Перед разложением не было обнаружено очевидного теплового сигнала (предполагалось, что температура плавления составляет >350 °С).

#: эндотерма предположительно связана с потерей остаточного растворителя или воды, а температура плавления предположительно составляет >350 °С.

Пример 10. Состав соединения 1, применяемый в клинических испытаниях

[0180] Соединение представляет собой перорально биодоступный селективный агонист рецептора тиреоидного гормона бета (THR-β) для лечения взрослых с умеренным или тяжелым нецирротическим неалкогольным стеатогепатитом (NASH). Соединение 1 классифицировали как соединение класса IV BCS и составляли в виде капсулы с немедленным высвобождением. Для повышения собственной растворимости активного вещества соединение 1 выделяют в виде калиевой соли лекарственного вещества, а лаурилсульфат натрия используют в качестве солюбилизующего средства в составе с немедленным высвобождением. Составленный продукт представляет собой сухую смесь, содержащую от 0,5 до 50 мг соединения 1 (эквиваленты свободной кислоты) в капсуле НРМС (гидроксипропилметилцеллюлоза) размером 0. В дополнение к солюбилизатору также исследовали и использовали в составе соединения 1 другие классы вспомогательных веществ, такие как разбавитель (такой как микрокристаллическая целлюлоза (МСС), маннит и т.д.), разрыхлитель (такой как кроскармеллоза натрия и т.д.), скользящее вещество (коллоидный диоксид кремния и т.д.) и смазывающее вещество (такой как стеарат магния и т.д.). Количественный состав лекарственной формы с единичной дозой активных капсул описана в таблице 15 ниже.

Таблица 15. Состав соединения 1, капсулы, 1 мг, 3 мг, 10 мг и 50 мг

Компонент	1 мг	3 мг	10 мг	50 мг
------------------	-------------	-------------	--------------	--------------

	Масса/мг	% масс./масс.						
Соединение 1 ^[1]	1,1	1,1	3,3	1,1	10,9	3,6	54,3	18,1
Микрокристаллическая целлюлоза	59,3	59,3	177,9	59,3	172,7	57,6	143,8	47,9
Маннит	29,6	29,6	88,8	29,6	86,4	28,8	71,9	24,0
Лаурилсульфат натрия	5,0	5,0	15,0	5,0	15,0	5,0	15,0	5,0
Кроскармеллоза натрия	3,0	3,0	9,0	3,0	9,0	3,0	9,0	3,0
Коллоидный диоксид кремния	1,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0
Стеарат магния	1,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0
Капсула НРМС, размер 0	1 капсула		1 капсула		1 капсула		1 капсула	
Всего	100,0	100,0	300,0	100,0	300,0	100,0	300,0	100,0

^[1] Дозировки 1 мг, 3 мг, 10 мг и 50 мг на основе свободной кислоты. Теоретическое содержание свободной кислоты соединения 1 в калиевой соли составляет 92,1%, а фактическое количество зависит от количественного определения серий лекарственного вещества, используемых в лекарственном препарате.

Пример 11. Исследование состава с прямой инкапсуляцией соединения 1

[0181] Проводили исследование состава с прямой инкапсуляцией (DE) соединения 1. Эта работа включала разработку процесса DE для приготовления капсул 1 мг, 3 мг, 10 мг, 50 мг и плацебо с помощью полуавтоматической или автоматической машины для наполнения капсул. Оценивали ингредиенты, соотношения, массу наполнения, текучесть и однородность состава. Разработанные способы являются подходящими для производства лекарственных препаратов на основе соединения 1 для будущих клинических исследований. Подготовка серий для подтверждения прототипа, краткосрочные исследования стабильности, подтверждение GMP и производство серий для демонстрации стабильности проводили для обеспечения успеха производства серий

GMP и их качества для предполагаемого клинического применения.

[0182] В ходе первоначального исследования состава соединения 1 исследовали типы солюбилизаторов, включая солюбилизаторы, такие как полоксамер 188 и анионное поверхностно-активное вещество лаурилсульфат натрия (SLS). SLS продемонстрировал хорошую совместимость с соединением 1 и повышал водную растворимость соединения 1. Исследовали уровень SLS от 1,5% до 5,0% масс./масс. Фармакокинетические данные показали, что использование определенного количества SLS в составе значительно улучшает биодоступность *in vivo*. Таким образом, 1,5-5,0% SLS является подходящим для дальнейшей разработки состава с соединением 1.

[0183] Для решения проблемы однородности дозы при различных уровнях дозы разрабатывали эффективный процесс смешивания. Для уровня дозы от 0,5 мг до 10 мг разрабатывали процесс смешивания равного количества. Соединение 1 первоначально смешивали со всем количеством SLS и частичным количеством MCC в равном количестве. Затем смесь смешивали с оставшимися вспомогательными веществами, пропускали через сито, а затем снова перемешивали (процесс смешивания-просеивания-смешивания). Благодаря объединению соединения 1 вместе со вспомогательными веществами, а не только с ними, потеря выхода соединения 1 во время процесса смешивания была эффективно снижена. Способ смешивания-просеивания-смешивания эффективно включал низкую дозу соединения 1 с вспомогательными веществами равномерно в составе с более высокими выходами, обеспечивая прямое заполнение капсулы или прямое таблетирование. Для составов от 10 мг до 50 мг использовали аналогичные процедуры смешивания и просеивания в дополнение к процессу смешивания в равном количестве, разработанному и описанному выше. Демонстрационные серии и серии GMP каждой дозировки показали, что результаты однородности смеси конечных смесей с использованием этого процесса смешивания соответствуют требуемым техническим параметрам препарата.

[0184] Массу заполнения капсул составов, содержащих соединение 1 в различных дозах и плацебо, рассчитывали на 300 мг, поскольку объем этого материала может удовлетворять потребности в полуавтоматическом наполнении капсулами № 0 в зависимости от объемной плотности конечных смесей. Полуавтоматическое наполнение можно использовать на ранней клинической стадии, когда требуются только небольшие размеры партий клинических лекарственных препаратов. Кроме того, также разработали полностью автоматический процесс наполнения капсул для удовлетворения крупномасштабных потребностей клинических исследований на более поздних стадиях.

[0185] Короткие исследования стабильности в стрессовых условиях при 60 °C /75% отн.вл. показали, что разлагающаяся примесь образуется при дозировке 3 мг через две недели. Впоследствии для упаковки предложили силикагелевый влагопоглотитель, который доказал свою эффективность для смягчения образования примеси.

[0186] Последующее производство демонстрационных серий для испытаний стабильности и GMP дозировкой 1 мг, 3 мг, 10 мг и 50 мг с использованием GMP

соединения 1 проводили в соответствии с конечным составом и способом. Эффективность силикагелевого влагопоглотителя в минимизации разложения оценивали с помощью сравнительных исследований стабильности с осушителем, включенным в первичную упаковку, или без него. Данные по стабильности явно продемонстрировали, что упаковка с влагопоглотителем значительно замедляла образование деградирующих примесей при 40 °C /75% отн.вл. Поэтому было определено, что упаковка с 1 г влагопоглотителя улучшает качество препарата и увеличивает срок хранения препарата.

[0187] *Пример 12. Клиническая оценка соединения 1 у здоровых субъектов с повышенным уровнем LDL-с*

[0188] Цели: Оценка общей безопасности и переносимости многократных возрастающих доз соединения 1 у здоровых субъектов с повышенным уровнем LDL-с.

[0189] Вторичные цели: Оценка PK и PD соединения 1 у здоровых субъектов с повышенным уровнем LDL-с после многократного введения возрастающих доз соединения 1.

[0190] Первичные конечные точки: нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE), основные показатели жизнедеятельности, клинико-лабораторные параметры и мониторинг электрокардиограммы (ЭКГ).

[0191] Вторичные конечные точки: PK параметры плазмы крови для соединения 1, PD маркеры взаимодействия с мишенью агониста THR- β , включая LDL-с и другие липидные параметры и глобулин, связывающий половые гормоны (SHBG).

[0192] Здоровых добровольцев с умеренно повышенным уровнем LDL-с рандомизировали в соотношении 3:1 в отношении соединения 1 (n=6) или плацебо (n=2). Добровольцы, рандомизированные в группу соединения 1, получали многократные дозы 1, 3, 6 или 10 мг соединения 1 один раз в день в течение 14 дней в когорте MAD исследования.

Результаты

[0193] Соединение 1, как правило, было безопасным и хорошо переносилось с аналогичной частотой АЕ во всех группах лечения соединением 1 и плацебо. Все АЕ были от легкой до умеренной степени тяжести без видимой зависимости от дозы. Один субъект, получавший плацебо (когорта 1 мг), досрочно прекратил участие в исследовании вследствие отзыва согласия; все субъекты, получавшие соединение 1, завершили исследование без преждевременного прекращения участия. Критерии прекращения исследования или критерии прекращения повышения дозы не были удовлетворены.

[0194] Биохимический анализ печени: значения ALT, AST, ALP и общего билирубина были в целом одинаковыми во всех группах лечения. Ни у одного субъекта, получавшего соединение 1, не наблюдали повышение уровня ALT до $\geq 2x$ ULN. Никаких доказательств DILI. Гормон щитовидной железы: отсутствие симптомов гипер/гипотиреоза. Средние значения TSH и свободного T3 были весьма изменчивыми, но, как правило, одинаковыми в разных группах. Дозозависимое снижение свободного T4 наблюдали в группах, получавших соединение 1, в соответствии с модуляцией

периферических гормонов щитовидной железы, наблюдаемой с другими агонистами THR. Другие лабораторные исследования (например, клинический биохимический анализ крови, общий анализ крови) не выявили явных тенденций.

[0195] Однократное ежедневное введение соединения 1 в дозах 1, 3, 6 и 10 мг в течение 14 дней было в целом безопасным и хорошо переносилось без клинических признаков или симптомов гипо/гипертиреоза или агонизма THR- α . Соединение 1 демонстрировало пропорциональную дозе РК с низкой вариабельностью и периодом полувыведения, подходящим для введения дозы один раз в день. Соединение 1 повышало уровень SHBG, ключевого маркера вовлечения печеночного THR- β , дозозависимым образом. Соединение 1 приводило к значимому снижению уровней циркулирующих атерогенных липидов, включая LDL-с, Apo B, общий холестерин и триглицериды. Взятые вместе, PD данные указывают на то, что введение соединения 1 приводило к устойчивому взаимодействию с мишенью THR- β в печени.

[0196] Пример 13. Влияние 12 недель монотерапии и комбинированных обработок соединением 2 и соединением 1 на метаболические параметры, патологию печени и показатель активности NAFLD, включая стадию фиброза, у самцов мышей DIO-NASH, подтвержденные биопсией

Перечень сокращений

Acta2	Гладкомышечный актин альфа 2
ALP	Щелочная фосфатаза
ALT	Аланинтрансаминаза
ANOVA	Дисперсионный анализ
AST	Аспартаттрансаминаза
BW	Масса тела
CD146	Молекула клеточной адгезии меланомы
cDNA	Комплементарная ДНК
CK18 M30	Цитокератин 18 M30
Colla1	Коллаген типа I альфа 1
DAB	3,3'-диаминобензидин
DEG	Дифференциально экспрессируемый ген
Dhcr7	7-дегидрохолестерин
DIO	Ожирение, вызванное диетой
DIO-GAN	Модель NASH Gubra Amylin с ожирением, вызванным диетой
ELISA	Иммуноферментный анализ
FFPE	Фиксированный формалином, залитый парафином
FPKM	Фрагменты на килобазу транскрипта на миллион картированных считываний

FXR	Рецептор фарнезоида X
g	g-сила
Gal-3	Галектин-3
GAN	NASH Gubra Amylin
H&E	Окрашивание гематоксилином и эозином
HDL-c	Холестерин липопротеинов высокой плотности
Hmgcs1	Гидроксиметилглутерарил-КоА-синтаза
HPMC	Гидроксипропилметилцеллюлоза
HRP	Пероксидаза хрена
ИНС	Иммуногистохимический анализ
кг	Килограмм
LDL-c	Холестерин липопротеинов низкой плотности
Lgals3	Галектин-3
мг	Миллиграмм
н.п.	Не применимо
NAFLD	Неалкогольная жировая болезнь печени
NAS	Индекс активности NAFLD
NASH	Неалкогольный стеатогепатит
NP-40	Нонидет Р-40
PO	Per os (пероральное введение дозы)
PSR	Пикросириус красный
QD	Один раз в день

[0197] *Введение*

[0198] Неалкогольный стеатогепатит (NASH), заболевание, проявляющееся воспалением и повреждением печени в контексте стеатоза печени, вероятно, потребует комбинированной терапии, нацеленной на несколько аспектов заболевания, для достижения высокого уровня разрешения заболевания. Для лечения NASH разрабатывают низкомолекулярные агонисты рецептора фарнезоида X (FXR), рецептора ядерного гормона, который поддерживает гомеостаз метаболических путей, и рецептора бета гормона щитовидной железы (THR-β), рецептора ядерного гормона, который регулирует метаболические пути, комплементарные FXR. Соединение 2, нестероидный агонист FXR, и соединение 1, распределенный по печени селективный агонист THR-β, оценивали отдельно и в комбинации в мышинной модели NASH, индуцированного диетой.

[0199] *Материалы и методы*

[0200] *Обращение с животными и дизайн исследования*

[0201] Самцам мышей C57BL/6JRj (n=138) вскармливали диету для NASH Gubra Amylin (GaN) (40% жира, 22% фруктозы, 2% холестерина [D09100310, исследовательские

диеты]) или постной диетой в течение 35 недель до начала обработки. Перед обработкой все животные прошли биопсию печени для гистологического подтверждения (оценка стеатоза ≥ 2 и стадия фиброза ≥ 1) и стратификацию с использованием индекса активности неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) (NAS) и системы стадирования фиброза. Мышей с ожирением, индуцированным диетой, находящиеся на диете GAN (DIO-GAN) рандомизировали в 8 групп обработки (таблица 16) на основе процента площади окрашивания пикросириусом красным (PSR). Мыши DIO-GAN (n=16 на группу) получали обработку (P0, QD) в течение 12 недель несущей средой (0,5% HPMS+0,2% Tween-80 в буфере Tris [50 мМ, pH 8]), соединением 2 (10 мг/кг), соединением 1 (0,3 мг/кг [низкая], 2 мг/кг [средняя] или 10 мг/кг [высокая]) или комбинированную обработку соединением 2 с соединением 1 (комбинир. - низкий уровень, комбинир. - средний уровень или комбинир. - высокий уровень). Контроли, получавшие несущую среду в виде постного корма, служили в качестве здоровых контролей (n=10). Мышей поддерживали на их соответствующих диетах (GAN или постный корм) в течение всего исследования. Сравнение внутри субъектов (до и после обработки) проводили для гистопатологических показателей биопсии печени. Конечные количественные конечные точки включали биохимический анализ плазмы крови/печени, гистоморфометрию печени и транскриптометрию печени с помощью RNAseq.

Таблица 16. Группы обработки

Группа	Доза	N
Контроль несущей средой с постным кормом	н.п.	10
Контроль несущей средой с DIO-GAN	н.п.	16
Соединение 2	10 мг/кг	16
Соединение 1 - низкий уровень	0,3 мг/кг	16
Соединение 1 - средний уровень	2 мг/кг	16
Соединение 1 - высокий уровень	10 мг/кг	16
Комбинир. - низкий уровень	10 мг/кг соединения 2+0,3 мг/кг соединения 1	16
Комбинир. - средний уровень	10 мг/кг соединения 2+2 мг/кг соединения 1	16
Комбинир. - высокий уровень	10 мг/кг соединения 2+10 мг/кг соединения 1	16

Группы обработки, назначенные для исследования. Контроли несущей средой с DIO-GAN вводили несущую среду (0,5% HPMS+0,2% Tween 80 в буфере Tris [pH 8]) один раз в день. н.п., неприменимо.

[0202] *Обработка и оценка биопсии печени*

[0203] Фиксированные формалином, залитые парафином (FFPE) биоптаты печени готовили путем помещения образцов печени в 10% нейтральный забуференный формалин

в течение ~24 часов, а затем переносили в 70% этанол перед хранением при 4 °С. FFPE помещали в Histokinette для инфильтрации перед заливкой в блоки. Затем ткани для биопсии разрезали на 3 мкм с использованием микротомы и устанавливали срезы на предметные стекла. Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для оценки стеатоза, воспаления и баллонирования, и PSR для оценки фиброза. Кроме того, срезы обрабатывали для обнаружения экспрессии белка коллагена I типа (Colla1), галектина-3 (Gal-3) и гладкомышечного актина (α -SMA) с помощью иммуногистохимического анализа (ИHC). Для окрашивания H&E предметные стекла инкубировали в гематоксилине Майера (Dako), промывали водопроводной водой, окрашивали в растворе эозина Y (Sigma-Aldrich), обезвоживали и закрывали покровным стеклом. Для PSR предметные стекла инкубировали в железном гематоксилине Вейгерта (Sigma-Aldrich), промывали в водопроводной воде, окрашивали в пикросириусом красным (Sigma-Aldrich) и дважды промывали в подкисленной воде. Избыток воды удаляли путем встряхивания микропрепаратов, а затем микропрепараты обезвоживали этанолом, очищали в ксилоле и закрывали крышкой. NAS и стадию фиброза оценивали, как описано ранее (Kleiner et al. 2005). NAS представляет собой невзвешенную сумму показателей и диапазонов стеатоза, воспаления и баллонирования для 0-8 (таблица 17); стадия фиброза колеблется от 0 (без фиброза) до 4 (цирроз). Для обнаружения Colla1, Gal-3 и α -SMA проводили ИHC по стандартным процедурам. Вкратце, после извлечения антигена и блокирования эндогенной активности пероксидазы срезы инкубировали с первичным антителом (Colla1: Southern Biotech, № в кат. 1310-01; Gal-3: Biolegend, № в кат. 125402; α -SMA: Abcam, № в кат. Ab124964). Первичное антитело обнаруживали с использованием полимерного конъюгата антитела с HRP-линкером. Первичное антитело визуализировали с помощью DAB в виде хромогена. Наконец, срезы контрокрашивали гематоксилином и проскальзывали.

Таблица 17. Гистологическая оценка NAS и фиброза

Функция	Степень	Индекс
Стеатоз (Процент гепатоцитов с липидными каплями)	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Лобулярное воспаление	Нет очагов	0
	<2 очагов	1
	2-4 очага	2
Дегенерация баллонирования	Нет	0
	Мало	1
	Много клеток/заметное баллонирование	2
Фиброз	Нет	0

Перисинусоидальный	или	1
перипортальный		2
Перисинусоидальный	и	3
портальный/перипортальный		4
Мостиковый фиброз		
Цирроз		

[0204] *Анализ ферментов печени, липидов плазмы крови и СК18 М30*

[0205] Конечную кровь собирали путем пункции сердца у мышей, анестезированных изофлураном (2-3%), смешивали с антикоагулянтом и помещали при 4°C перед центрифугированием при 3000 x g в течение 10 минут. Супернатанты плазмы крови переносили в новые пробирки и немедленно замораживали на сухом льду и хранили при -80 °С. Аланинтрансаминазу (ALT), аспартаттрансаминазу (AST), щелочную фосфатазу (ALP), триглицериды (TG), общий холестерин (TC), липопротеин высокой плотности (HDL-с) и липопротеин низкой плотности (LDL-с) измеряли с использованием коммерческих наборов (Roche Diagnostics) на автоанализаторе Cobas с 501 в соответствии с инструкциями производителя. Цитокератин 18 М30 (СК18 М30) измеряли из плазмы крови с использованием коммерческого набора для ELISA (Cusabio) в соответствии с инструкциями производителя.

[0206] *Анализ липидов печени*

[0207] Образцы печени гомогенизировали и TG и TC экстрагировали в 5% NP-40 путем нагревания (2x) при 90 °С. Образцы центрифугировали и измеряли содержание TG и TC в супернатанте с использованием коммерческих наборов (Roche Diagnostics) на автоанализаторе Cobas с 501 в соответствии с инструкциями производителя.

[0208] *Транскриптомный анализ печени с помощью RNAseq*

[0209] Ткань собирали и мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до обработки. РНК выделяли с использованием набора NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL). В общей сложности от 10 нг до 1 мкг очищенной РНК из каждого образца использовали для создания библиотек cDNA с использованием набора для направленного получения библиотеки РНК NEBNext Utra II для Illumina (New England Biolabs). Затем библиотеки cDNA секвенировали на NextSeq 500 с использованием высокопроизводительного набора NextSeq 500/550 V2 (Illumina). Данные секвенирования выравнивали с геномом мыши с использованием программного обеспечения для выравнивания сплайсированных транскриптов с эталонным (STAR) программным обеспечением. Дифференциально экспрессируемые гены идентифицировали с использованием R-пакета DESeq2.

[0210] *Анализ остаточных уровней соединения в плазме крови*

[0211] Конечные образцы плазмы крови собирали с помощью сердечной пункции через примерно 21-24 часа после последнего введения соединения(ий). Конечные образцы плазмы крови анализировали с помощью LC-MS/MS с высоким разрешением с

использованием инструмента Triple Quad 6500+. 20 мкл образца плазмы крови смешивали с 200 мкл внутреннего стандартного раствора (100 нг/мл лабеталола+100 нг/мл толбутамида в ацетонитриле), перемешивали на вортексе и центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 15 минут при 4 °С. Супернатант (100 мкл) переносили на планшет для образцов, смешивали с водой (100 мкл) и встряхивали (800 об./мин.) в течение 10 минут перед инъекцией (2 мкл) на 1,7 мкм на колонке ACQUITY UPLC BEH C18 (воды) 2,1×50 мм с использованием градиента (таблица 18) подвижной фазы 0,1% муравьиной кислоты в воде (подвижная фаза А) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (подвижная фаза В) со скоростью потока 0,6 мл/мин. Для количественного определения соединения 2 (время удерживания: 0,87 мин.) и соединения 1 (время удерживания: 0,97 мин.) использовали два внутренних стандарта: стандарт 1 (время удерживания: 0,87 мин.) и стандарт 2 (время удерживания: 0,96 мин.) соответственно. Внутренний стандарт (время удерживания: 0,76 мин.) использовали для количественного определения метаболита глюкуронида соединения 2 (время удерживания: 0,77 мин.). Калибровочные кривые (1-3000 нг/мл) получали в матрице плазмы крови мыши (объединенный контрольный растворитель) для каждого анализируемого вещества.

Таблица 18. Градиент LC-MS/MS

Время (мин.)	Подвижная фаза В (%)
Исходн. значение	35
1,00	98
1,70	98
1,71	35
2,20	Остановка

[0212] *Результаты*

[0213] *Обзор дизайна исследования*

[0214] Модель ожирения, индуцированного диетой, NASH Gubra Amylin (DIO-GAN) повторяет многие гистопатологические особенности NASH человека (Hansen 2020). Модель DIO-GAN использовали для оценки эффективности агониста FXR, соединения 2, и агониста THR-β, соединения 1 в качестве отдельных средств и в комбинации. Чтобы вызвать заболевание NASH мышам C57BL/6Jrj поддерживали диету с высоким содержанием жиров, холестерина и фруктозы (диета GAN) в течение >35 недель. Перед терапевтическим вмешательством мышам проводили биопсию для оценки тяжести заболевания NASH и фиброза; мышей с оценкой стеатоза <2 и стадией фиброза <1 исключали из исследования. Затем мышей DIO-GAN рандомизировали в 8 групп обработки (n=16 на группу) на основе процента ой дробной площади окрашивания пикросириусом красным (PSR) биоптата до лечения, а также массы жировой ткани тела, определенной с помощью эхомагнитно-резонансной томографии всего тела (EchoMRI). В группах обработки на основе монотерапии соединение 2 вводили через желудочный зонд один раз в день в дозе 10 мг/кг, тогда как соединение 1 вводили через желудочный зонд

один раз в день в дозах 0,3 (соединение 1 - низкая), 2 (соединение 1 - средняя) или 10 (соединение 1 - высокая) мг/кг. В группах комбинированных обработок постоянный уровень дозы соединения 2 (10 мг/кг) комбинировали с низкими, средними и высокими дозами соединения 1 (т.е., комбинир. - низкий уровень, комбинир. - средний уровень, комбинир. - высокий уровень соответственно). В качестве контроля использовали мышей DIO-GAN, которым вводили несущую среду через пероральный зонд один раз в день. Мышей обрабатывали в общей сложности 12 недель и поддерживали на диете GAN на протяжении всего исследования. Тощие мыши (n=10), которых поддерживали на диете с нормальным кормом на протяжении всего исследования, служили в качестве здоровых контролей.

[0215] *Влияние обработки на массу тела, потребление пищи и массу печени*

[0216] Обработка соединением 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 (дозы в группах комбинир. - низкий уровень, комбинир. - средний уровень, комбинир. - высокий уровень) снижала массу тела во время исследования (фиг. 30А). В конце исследования группы лечения соединением 2, комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень демонстрировали массу тела значительно ниже, чем контрольная группа с несущей средой DIO-GAN (фиг. 30В). Снижение массы тела, по-видимому, не было связано со снижением потребления пищи (фиг. 31). Во всех группах обработки значительно нормализовалась гепатомегалия (фиг. 32А), при этом наибольшее снижение массы печени наблюдали в группах комбинированных обработок (комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень); изменения массы селезенки не были значимыми (фиг. 32В).

[0217] *Влияние обработки на состав массы тела*

[0218] Состав тела определяли на исходном уровне (неделя -1) и на неделе 11 исследования с помощью EchoMRI всего тела для определения относительных уровней мышечной и жировой ткани в процентах от массы тела. Исходные уровни мышечной и жировой ткани были хорошо сбалансированы между группами обработки (фиг. 33А и 33В). Обработка соединением 2 и в комбинации с соединением 1 снижала уровни жировой ткани на неделе 11 (фиг. 34А); значимое увеличение относительной массы мышечной ткани наблюдали в группах обработки соединением 2 и комбинированных обработок (фиг. 34В).

[0219] *Влияние обработки на уровни липидов в плазме крови и печени*

[0220] Во всех группах обработки значительно снижался общий холестерин в плазме крови (ТС, фиг. 35А А), причем наибольшее снижение наблюдали при комбинированной обработке (комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень); аналогичные тенденции наблюдали для ТС в печени (фиг. 35В). Снижение уровня холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности в плазме крови (HDL-с и LDL-с соответственно) соответствовало эффектам, наблюдаемым при ТС. Соединение 2 и соединение 1 в высокой концентрации, а также комбинированные обработки значительно снижали уровень триглицеридов в плазме крови (TG, фиг. 36А); уровни TG в печени были

значимо снижены только в группе комбинированной обработки в высокой концентрации (фиг. 36B).

[0221] *Влияние обработки на живые ферменты*

[0222] Обработка на основе монотерапии соединением 1 (низким, средним и высоким уровнем) значимо снижала уровни ALT по сравнению с контролем носителем DIO-GAN (фиг. 37A); уровни ALT не были значимо снижены при комбинированной обработке. Уровни AST демонстрировали аналогичную тенденцию к ALT, хотя ни одна из групп обработки значимо не отличалась от контроля несущей средой DIO-GAN (фиг. 37B). Уровни ALP значимо не отличались от контроля несущей средой DIO-GAN ни в одной из групп обработки, хотя ALP был численно ниже в группах обработки на основе монотерапии (соединение 2, соединение 1 - низкий уровень и соединение 1 - средний уровень) и выше в группах обработки комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN (фиг. 38).

[0223] *Гистология печени*

[0224] *Индекс активности NAFLD (NAS)*

[0225] Для оценки гистологических эффектов обработки использовали индекс активности NAFLD (NAS). NAS определяется как невзвешенная сумма гистологических показателей стеатоза, воспаления и баллонирования и может варьироваться от 0 до 8. NAS определяли для каждого животного до (исходного уровня) и после 12 недель обработки в конце исследования. NAS был хорошо сбалансирован в группах обработки с диапазоном NAS 5-6 на исходном уровне у большинства мышей (фиг. 39A). После 12 недель обработки NAS был значимо улучшен в большинстве групп обработки с наиболее значительными улучшениями, наблюдаемыми при комбинированной обработке (фиг. 39B). В группе обработки соединением 2 у 56% животных наблюдали улучшение NAS на ≥ 1 пункт по сравнению с 31%, 27% и 62% в группах обработки соединением 1 при низком уровне, соединением 1 при среднем уровне и соединением 1 при высоком уровне соответственно (таблица 19). Комбинированная обработка было более эффективной: у 69%, 81% и 100% мышей наблюдали улучшение NAS на ≥ 1 пункт в группах комбинированной обработки комбинир. - низкий уровень, комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень соответственно. Кроме того, степень улучшения NAS была выше в группах комбинированной обработки. В то время как 0% мышей в группе обработки соединением 2 улучшили NAS на > 1 пункт, 19%, 25% и 43% мышей в комбинированных группах комбинир. - низкий уровень, комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень соответственно достигали улучшения NAS ≥ 2 пунктов. Эти результаты были выше, чем в группах обработки на основе монотерапии соединением 1, в которых 0%, 7% и 25% мышей достигли улучшения NAS ≥ 2 пунктов в группах соединение 1 - низкий уровень, соединение 1 - средний уровень и соединения 1 - высокий уровень соответственно.

Таблица 19. Влияние лечения на индекс активности NAFLD (NAS)

Обработка (n)	Без	Ухудшение	Улучшение
---------------	-----	-----------	-----------

	изменений % (n)	% (n)			
		≥1 пункта	1 пункт	≥2 пунктов	Всего
Безжировой контроль (10)	80% (8)	10% (1)	10% (1)	0	10% (1)
Контроль DIO-GAN (16)	68,75% (11)	25% (4)	6,25% (1)	0	6,25% (1)
Соединение 2 (16)	43,7% (7)	0	56,25% (9)	0	56,25% (9)
Соединение 1 - низкий уровень (16)	56,25% (9)	12,5% (2)	31,25% (5)	0	31,25% (5)
Соединение 1 - средний уровень (15)	73,33% (11)	0	20% (3)	6,7% (1)	26,7% (4)
Соединение 1 - высокий уровень (16)	31,25% (5)	6,25% (1)	37,5% (6)	25% (4)	62,5% (10)
Комбинир. - низкий уровень (16)	18,75% (3)	12,5% (2)	50% (8)	18,75% (3)	68,75% (11)
Комбинир. - средний уровень (16)	18,75% (3)	0	56,25% (9)	25% (4)	81,25% (13)
Комбинир. - высокий уровень (14)	0	0	57,1% (8)	42,9% (6)	100% (14)

[0226] *Стеатоз*

[0227] Улучшения NAS были в значительной степени обусловлены большим снижением стеатоза (таблица 20Error! Reference source not found.). В группе соединения 2 у 81% наблюдали нормализацию стеатоза в конце обработки, хотя максимальное улучшение составляло 1 пункт. В группах обработки на основе монотерапии соединением 1 наблюдали дозозависимое увеличение процента мышей, демонстрирующих нормализацию стеатоза, соответствующее 31%, 47% и 81% мышей в группах соединения 1 - низкий уровень, соединения 1 - средний уровень и соединение 1 - высокий уровень соответственно. В каждой группе обработки на основе монотерапии соединением 1 у одной мыши (т.е. ~6%) наблюдали нормализацию стеатоза на ≥2 пункта. В отличие от этого, у 25%, 31% и 71% мышей в группах обработки комбинир. - низкий уровень,

комбинир. - средний уровень и комбинир. - высокий уровень наблюдали нормализацию стеатоза ≥ 2 пунктов соответственно. Эти эффекты подтверждали количественной гистоморфометрией печени, которая показала уменьшенный процент гепатоцитов, содержащих липидные капли (фиг. 40А), и более низкие уровни липидов печени (фиг. 40В), а также меньший размер липидных капель (фиг. 41).

Таблица 20. Влияние обработки на оценку гистологического стеатоза

Обработка (n)	Без изменений % (n)	Улучшение % (n)		
		1 пункт	≥ 2 пунктов	Всего
Безжировой контроль (10)	100% (10)	0	0	0
Контроль DIO-GAN (16)	81,25% (13)	18,75% (3)	0	18,75% (3)
Соединение 2 (16)	18,75% (3)	81,25% (13)	0	81,25% (13)
Соединение 1 - низкий уровень (16)	68,75% (11)	25% (4)	6,25% (1)	31,25% (5)
Соединение 1 - средний уровень (15)	53,33% (8)	40% (6)	6,7% (1)	46,7% (7)
Соединение 1 - высокий уровень (16)	18,75% (3)	75% (12)	6,25% (1)	81,25% (13)
Комбинир. - низкий уровень (16)	6,25% (1)	68,75% (11)	25% (4)	93,75% (15)
Комбинир. - средний уровень (16)	6,25% (1)	62,5% (10)	31,25% (5)	93,75% (15)
Комбинир. - высокий уровень (14)	0	28,6% (4)	72,4% (10)	100% (14)

[0228] Комбинация соединения 2 и соединения 1 приводила к большей нормализации стеатоза печени. Стеатоз печени определяли по гистологии на исходном уровне и в конце обработки для каждой отдельной мыши. В таблице 29 показан процент мышей в каждой группе обработки без изменения или улучшения (снижение на 1 пункт и ≥ 2 пунктов по сравнению с исходным уровнем) оценки стеатоза. Общее представляет собой процент мышей в каждой группе обработки, демонстрирующих нормализацию стеатоза по меньшей мере на 1 пункт по сравнению с исходным уровнем.

[0229] *Баллонирование, воспаление и фиброз*

[0230] Гепатоцеллюлярное баллонирование, показатель апоптоза, наблюдали нечасто и он значимо не изменялся ни при одной из обработок. СК18 М30, биомаркер плазмы крови, ассоциированный с апоптозом, также значимо не отличался между

группами обработки и контролем несущей средой DIO-GAN (фиг. 42). Лобулярное воспаление не было значимо нормализовано при обработке, хотя нормализацию показателей воспаления наблюдали, хотя и нечасто, в группах обработки соединением 1 - низкий уровень, соединением 1 - средний уровень и соединением 1 высокий уровень, а также в комбинированной группе комбинированной обработки (таблица 21). Для дополнительной оценки воспаления экспрессию белка галектина-3 (Gal-3), маркера инфильтрации воспалительных лимфоцитов, определяли с помощью иммуногистохимического (ИНС) окрашивания печени. Обработка соединением 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 (комбинир. - низкий уровень) приводила к более низким уровням экспрессии Gal-3 в печени по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN (фиг. 43А).

Таблица 21. Влияние обработки на лобулярное воспаление

Обработка (n)	Ухудшение % (n)	Без изменений % (n)	Улучшение % (n)
Безжировой контроль (10)	10% (1)	80% (8)	10% (1)
Контроль DIO-GAN (16)	31,25% (5)	68,75% (11)	0
Соединение 2 (16)	31,25% (5)	68,75% (11)	0
Соединение 1 - низкий уровень (16)	25% (4)	68,75% (11)	6,25% (1)
Соединение 1 - средний уровень (15)	20% (3)	73,3% (11)	6,7% (1)
Соединение 1 - высокий уровень (16)	31,25% (5)	56,25% (9)	12,5% (2)
Комбинир. - низкий уровень (16)	31,25% (5)	68,75% (11)	0
Комбинир. - средний уровень (16)	31,25% (5)	62,5% (10)	6,25% (1)
Комбинир. - высокий уровень (14)	35,7% (5)	64,3% (9)	0

[0231] Воспаление не было значимо нормализовано при обработке. Лобулярное воспаление определяли по гистологии на исходном уровне и в конце обработки. В таблице 30 показан процент мышей в каждой группе обработки с ухудшением (увеличение на ≥ 1 пункт по сравнению с исходным уровнем), отсутствием изменений или улучшением (уменьшение на ≥ 1 пт по сравнению с исходным уровнем) показателей лобулярного воспаления.

[0232] Улучшения в стадии фиброза чаще наблюдали в группах комбинированной обработки по сравнению с группами монотерапии, хотя различия не достигали значимости (таблица 22). Изменения экспрессии белка Col1a1, определенные с помощью ИНС окрашивания печени, значимо не различались между группами обработки. Числовое снижение α -SMA, маркера активации звездчатых клеток печени, наблюдали в группе обработки соединением 2, соединением 1 при низком уровне и соединением 1 при среднем уровне. Значимое снижение наблюдали только в группе комбинированной обработки с низким уровнем (фиг. 43В).

Таблица 22. Влияние обработки на фиброз печени

Обработка (n)	Ухудшение % (n)	Без изменений % (n)	Улучшение % (n)
Безжировой контроль (10)	0	100% (10)	0
Контроль DIO-GAN (16)	31,25% (5)	68,75% (11)	0
Соединение 2 (16)	37,5% (6)	56,25% (9)	6,25% (1)
Соединение 1 - низкий уровень (16)	31,25% (5)	62,5% (10)	6,25% (1)
Соединение 1 - средний уровень (15)	26,7% (4)	60% (9)	13,33% (2)
Соединение 1 - высокий уровень (16)	25% (4)	68,75% (11)	6,25% (1)
Комбинир. - низкий уровень (16)	37,5% (6)	43,75% (7)	18,75 (3)
Комбинир. - средний уровень (16)	18,75% (3)	75% (12)	6,25% (1)
Комбинир. - высокий уровень (14)	21,4% (3)	50% (7)	28,6% (4)

[0233] Нормализацию фиброза чаще наблюдают при комбинированной обработке. Стадию фиброза печени определяли по гистологии на исходном уровне и в конце обработки. В таблице 31 показан процент мышей в каждой группе обработки с ухудшением (≥ 1 -стадийное увеличение от исходного уровня), отсутствием изменений или улучшением (≥ 1 -стадийное уменьшение от исходного уровня) фиброза.

[0234] *Анализ транскриптомики печени с помощью RNAseq*

[0235] Терминальные образцы печени (n=10) из групп обработки обрабатывали для анализа транскриптомики с помощью RNAseq. Дифференциально экспрессируемые гены (DEG) идентифицировали по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN. DEG идентифицировали во всех группах обработки; наименьшее количество в группе обработки соединением 1 - низкий уровень (987) и наибольшее количество DEG в группе комбинир. - высокий уровень (3533). Сравнение групп от соединения 1 - высокий уровень до комбинир. - высокий уровень показало, что гены, участвующие в энергетическом и липидном метаболизме, дифференциально экспрессировались в большей степени при комбинированной обработке (фиг. 44). На это указывает сравнение наклонов для линии идентичности (пунктирная линия, наклон =1) с линией линейной регрессии (сплошная линия, наклон=0,55) значений кратности. Скваленэпоксидаза (Sqle) и 7-дегидрохолестеринредуктаза (Dhcr7), ферменты, участвующие в метаболизме холестерина, экспрессировались при значимо более высоких уровнях в комбинированных группах по сравнению с обработкой на основе монотерапии (фиг. 45A и 45B). Гидроксиметилглутарил-КоА-синтаза (Hmgcs1), ключевой фермент в энергетическом метаболизме, продемонстрировала аналогичный паттерн экспрессии (фиг. 45C). Стеароил-КоА десатураза (Scd1), фермент, участвующий в метаболизме жирных кислот, снижалась при обработке соединением 2 и дополнительно снижалась при комбинированной обработке (фиг. 45D).

[0236] Наконец, авторы настоящего изобретения исследовали экспрессию

отдельных генов, ассоциированных с фиброзом и воспалением, включая коллаген типа I альфа 1 (Colla1), гладкомышечный актин альфа 2 (Acta2), галектин 3 (Lgals3) и молекулу адгезии клеток меланомы (CD146). В целом, соединение 2 отдельно и в комбинации с соединением 1 значимо снижало экспрессию этих генов по сравнению с контролем несущей средой DIO-GAN (фиг. 46); группы комбинированной обработки значимо не отличались от обработки соединением 2 отдельно.

[0237] *Обзор*

[0238] Мышиную модель ожирения, индуцированного диетой NASH Gubra-Amylin (DIO-GAN), использовали для оценки эффективности соединения 2 и соединения 1 в качестве монотерапии и в комбинации по метаболическим и гистопатологическим параметрам NASH и фиброза. Эта модель была подробно охарактеризована и воспроизводит многие аспекты NASH человека (Hansen 2020) без использования гепатотоксических средств для индукции заболевания. В этой модели мышей поддерживали на диете с высоким содержанием жиров, холестерина и фруктозы (диета GAN) в течение >35 недель. Перед терапевтическим вмешательством мышам проводили биопсию для оценки индекса активности NAFLD (NAS) и тяжести фиброза по гистологии; в исследовании использовали только мышей с исходным показателем стеатоза > 2 и стадией фиброза > 1. Важно отметить, что этот этап предварительного отбора гарантирует, что в исследовании использовали только мышей со значительной активностью NAFLD. Кроме того, знание NAS на исходном уровне позволяет оценивать терапевтические ответы не только по отношению к контролю несущей средой DIO-GAN, но и по отношению к отдельным значениям на исходном уровне. Мышей DIO-GAN обрабатывали соединением 2 и соединением 1 отдельно и в комбинации в течение 12 недель и поддерживали на диете GAN на протяжении всего исследования. Мышей обрабатывали однократным уровнем дозы соединения 2, отдельно или в комбинации с 3 уровнями дозы (низкий уровень [0,3 мг/кг], средний уровень [2 мг/кг] и высокий уровень [10 мг/кг]) соединения 1, чтобы максимизировать способность различать потенциальные аддитивные терапевтические эффекты.

[0239] Комбинация соединения 2 и соединения 1 показала большее снижение NAS по сравнению с обработкой на основе монотерапии как с точки зрения процента мышей, демонстрирующих снижение NAS, так и с точки зрения величины улучшения NAS. Улучшения NAS были в значительной степени обусловлены большим снижением стеатоза, что было ассоциировано с большим снижением общего холестерина и триглицеридов в плазме крови и печени. Большие общие эффекты, наблюдаемые при комбинированной обработке, по-видимому, не были обусловлены более высоким воздействием отдельных лекарственных средств в группах комбинированной обработки (таблица 23). Кроме того, хотя изменения массы тела, возможно, способствовали улучшению NAS, снижение массы тела было аналогичным между группами комбинированной обработки соединением 2 и группами комбинированной обработки (комбинир. - низкий уровень и комбинир. - средний уровень), что позволяет

предположить, что потеря массы тела сама по себе не полностью объясняет большую антистеатотическую активность комбинированной обработки. Вместо этого комбинированная обработка оказывала большее влияние на экспрессию генов, связанных с энергетическим и липидным метаболизмом. Эти результаты свидетельствуют о том, что комбинация соединения 2 и соединения 1, по-видимому, оказывает по меньшей мере аддитивное действие на эти пути и, вероятно, отвечает за наблюдаемую большую антистеатотическую активность.

[0240] Гистологическое улучшение при воспалении и фиброзе не было значимо улучшено при обработке. Однако были отмечены признаки нормализации фиброза, включая большее количество мышечных пучков, демонстрирующих нормализацию фиброза при применении комбинации. Кроме того, анализ транскриптомики выявил ключевые маркеры фиброза и воспаления, которые были снижены при комбинированной обработке. Экспрессия этих генов также снижалась при обработке соединением 2, что позволяет предположить, что агонизм FXR может быть основным фактором влияния на фиброз и воспаление на уровне экспрессии генов. В этом случае агонизм FXR можно считать комплементарным более антистеатотическому механизму агонизма THR- β . Вместе с более сильными антистеатотическими эффектами, наблюдаемыми при комбинировании соединения 2 и соединения 1, эти результаты свидетельствуют о том, что эта комбинация может затрагивать множество аспектов заболевания NASH.

[0241] *Список литературы*

[0242] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.

[0243] Hansen, H.H., Aegidius, H.M., Oró, D. et al. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* 20, 210 (2020).

[0244] *Дополнение*

Таблица 23. Минимальные концентрации лекарственного средства в плазме крови, определяемые с помощью LC-MS/MS

Средняя минимальная концентрация аналита (SD), нг/мл

Группа обработки (n)	Соединение 2	Глюкуронидный метаболит соединения 2	Соединение 1
Соединение 2 (16)	7,4 (3,8)	52,7 (26,0)	Н.о.
Соединение 1 - средний уровень (15)	Н.о.	Н.о.	135,5 (62,0)
Соединение 1 - высокий уровень (16)	Н.о.	Н.о.	320,0 (189,9)

Комбинир. - средний уровень (16)	5,8 (3,5)	53,1 (36,8)	49,5 (42,9)
Комбинир. - высокий уровень (14)	3,3 (1,8)	49,0 (23,7)	143,0 (87,9)

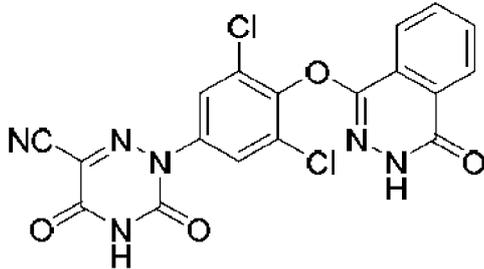
[0245] Образцы конечной плазмы, собранные с помощью сердечной пункции через 21-24 часа после конечной дозы обработки (т.е. минимальной), анализировали с помощью LC-MS/MS. Значения представляют собой среднее значение и стандартное отклонение (SD). Н.о., не определено.

[0246] Все публикации, включая патенты, патентные заявки и научные статьи, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, включая патент, патентную заявку или научную статью, была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

[0247] Хотя вышеприведенное изобретение было описано довольно подробно в качестве иллюстрации и примера в целях ясности понимания, специалистам в данной области техники очевидно, что некоторые незначительные изменения и модификации будут осуществлены на практике в свете вышеизложенного. Следовательно, описание и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента, нуждающегося в этом, включающий пероральное введение пациенту соединения формулы:



или его фармацевтически приемлемой соли один раз в день в дозе от около 0,5 мг до около 25 мг.

2. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе от около 1 мг до около 15 мг.

3. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе от около 2 мг до около 10 мг.

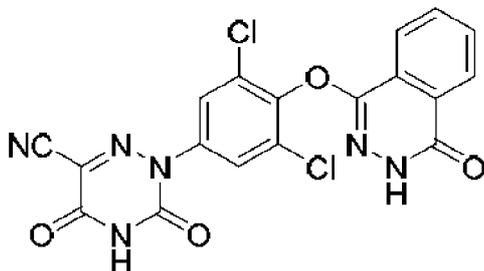
4. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе около 1 мг.

5. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе около 3 мг.

6. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе около 6 мг.

7. Способ по п. 1, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в день в дозе около 10 мг.

8. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента, нуждающегося в этом, включающий пероральное введение пациенту соединения формулы:



или его фармацевтически приемлемой соли с получением площади под кривой от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) в равновесном состоянии от около 2500 нг*ч/мл до около 50000 нг*ч/мл.

9. Способ по п. 8, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе с получением $AUC_{0-\infty}$ в равновесном состоянии от около 5000 нг*ч/мл до около 50000 нг*ч/мл.

10. Способ по п. 8, где соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе с получением $AUC_{0-\infty}$ в равновесном состоянии от около 5000 нг*ч/мл до около 25000 нг*ч/мл.

11. Способ по любому из пп. 8-10, где соединение вводят перорально один раз в день.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где соединение вводят в виде калиевой соли.

13. Способ по любому из пп. 1-11, где соединение вводят в виде натриевой соли.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где соединение вводят в фармацевтической композиции, содержащей ионное поверхностно-активное вещество.

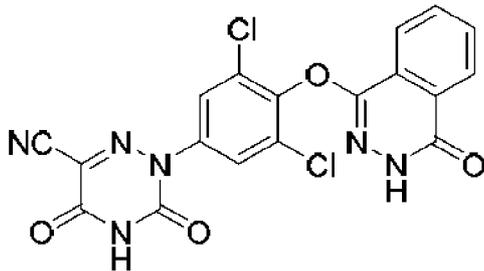
15. Способ по п. 14, где ионное поверхностно-активное вещество представляет собой лаурилсульфат натрия.

16. Способ по п. 15, где лаурилсульфат натрия присутствует в композиции в количестве от около 1% до около 8% по массе.

17. Способ по п. 15, где лаурилсульфат натрия присутствует в композиции в количестве от около 1% до около 5% по массе.

18. Способ по п. 15, где лаурилсульфат натрия присутствует в композиции в количестве около 5% по массе.

19. Кристаллическая калиевая соль соединения формулы:



20. Кристаллическая калиевая соль по п. 19, полученная с помощью способа примера 8.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 19 или п. 20.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет от около 1 мг до около 15 мг.

23. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет от около 2 мг до около 10 мг.

24. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет около 1 мг.

25. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет около 3 мг.

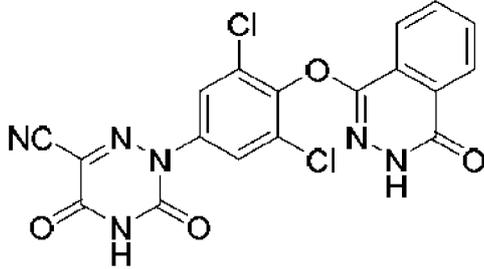
26. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет около 6 мг.

27. Фармацевтическая композиция по п. 21, где количество соединения в фармацевтической композиции составляет около 10 мг.

28. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 21-27, дополнительно содержащая ионное поверхностно-активное вещество.

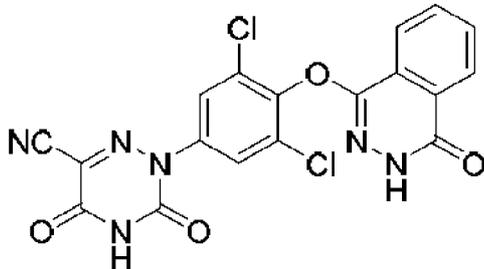
29. Фармацевтическая композиция по п. 28, где ионное поверхностно-активное вещество представляет собой лаурилсульфат натрия.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы:



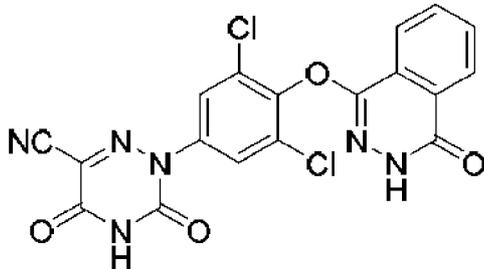
или его фармацевтически приемлемую соль и лаурилсульфата натрия.

31. Кристаллическая калиевая соль соединения формулы:



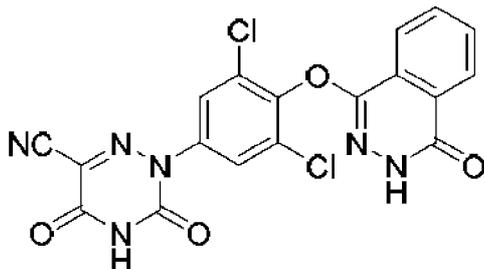
имеющая спектр XRPD по сути такой, как показано на фиг. 16.

32. Кристаллическая калиевая соль соединения формулы:



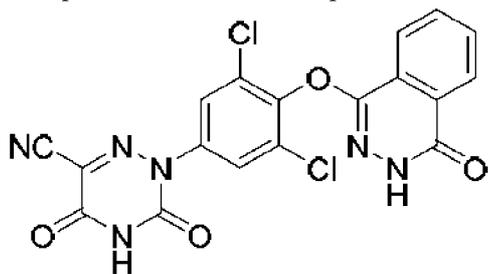
имеющая спектр XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$ и $20,51 \pm 0,20$ градуса.

33. Кристаллическая натриевая соль соединения формулы:



имеющая спектр XRPD по сути такой, как показано на фиг. 18.

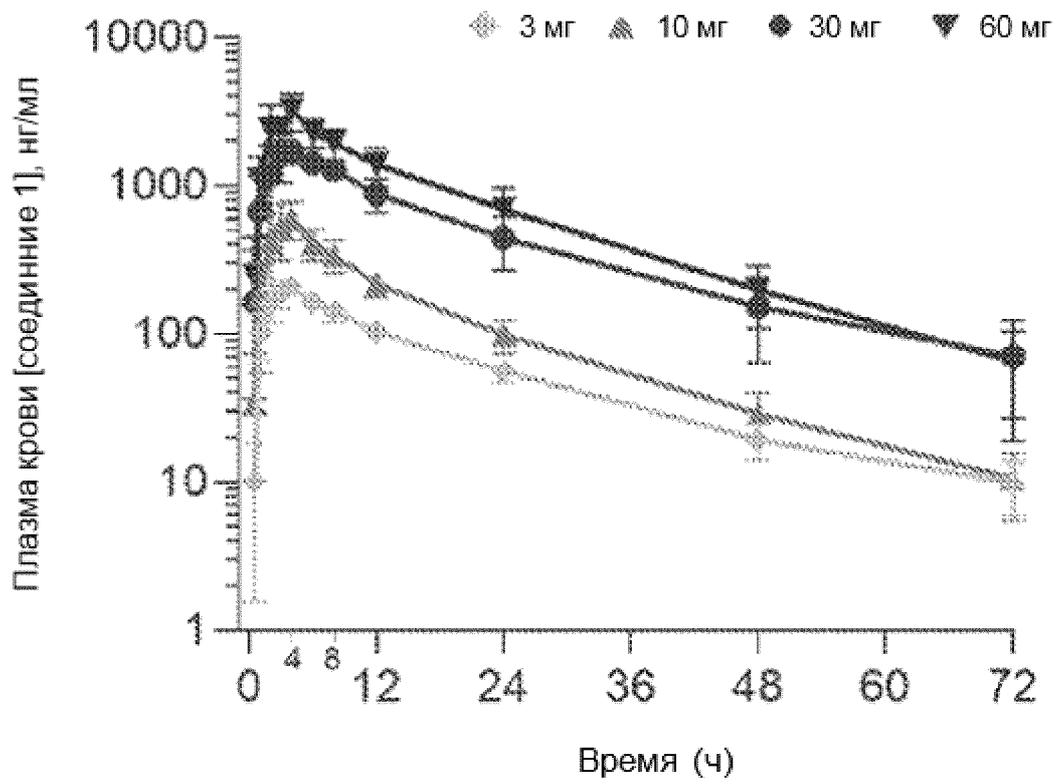
34. Кристаллическая натриевая соль соединения формулы:



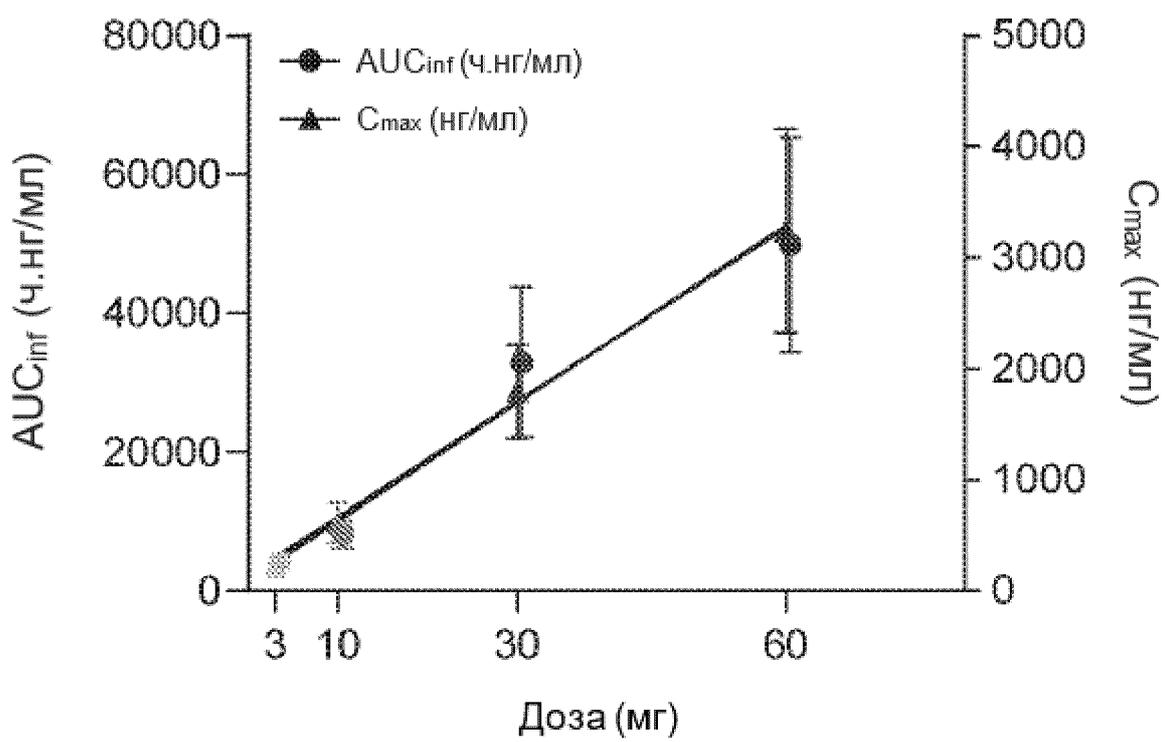
имеющая спектр XRPD, содержащий пики при углах 2-тета $5,51 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$ и $16,57 \pm 0,20$ градуса.

По доверенности

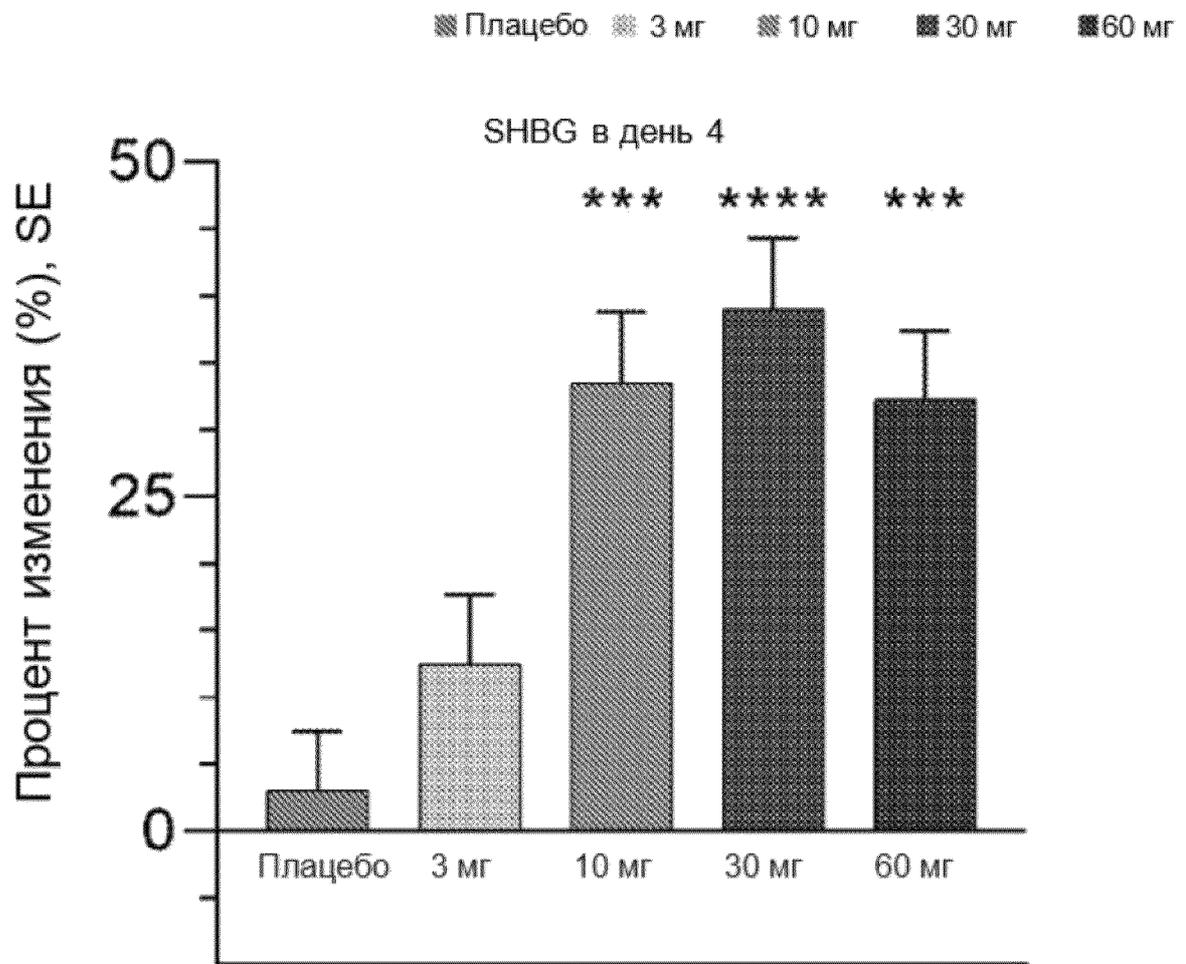
1/46



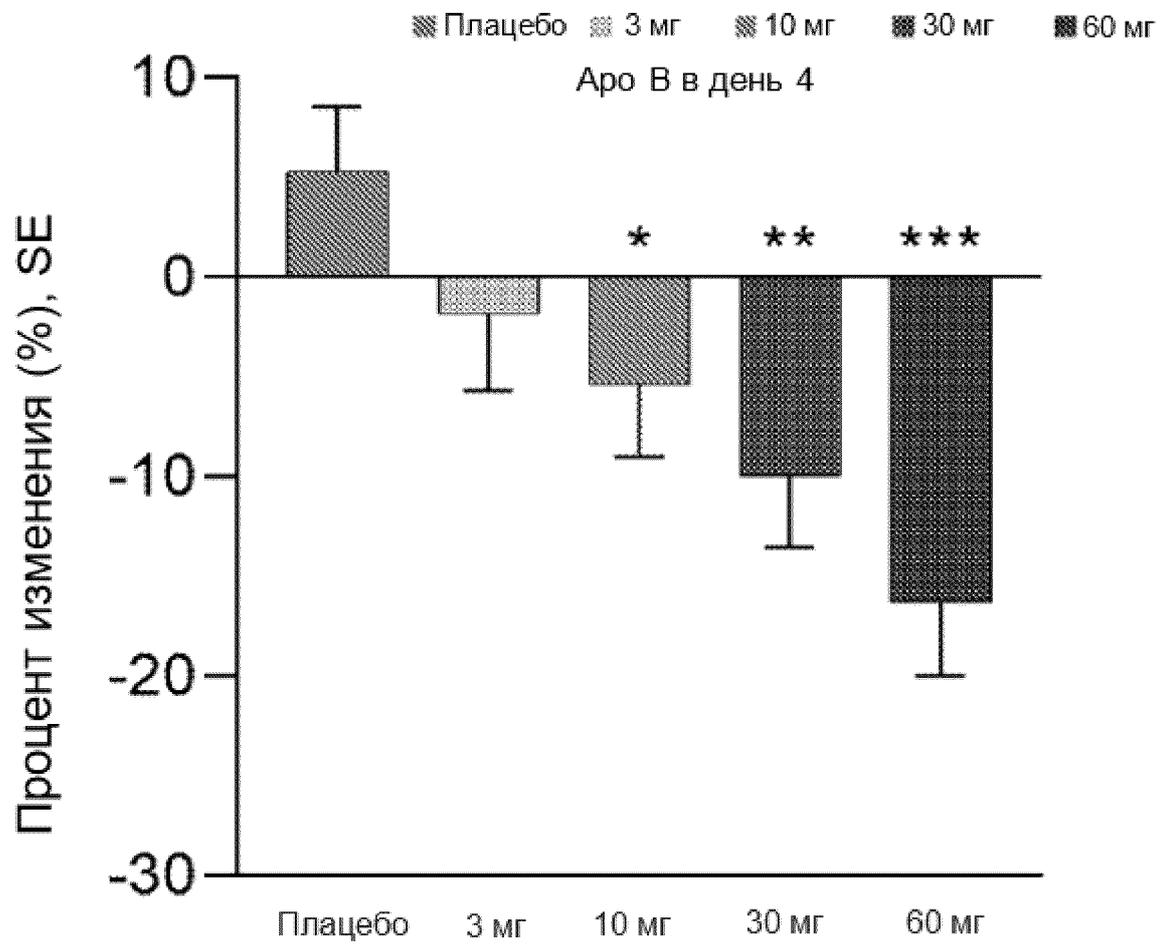
Фиг. 1



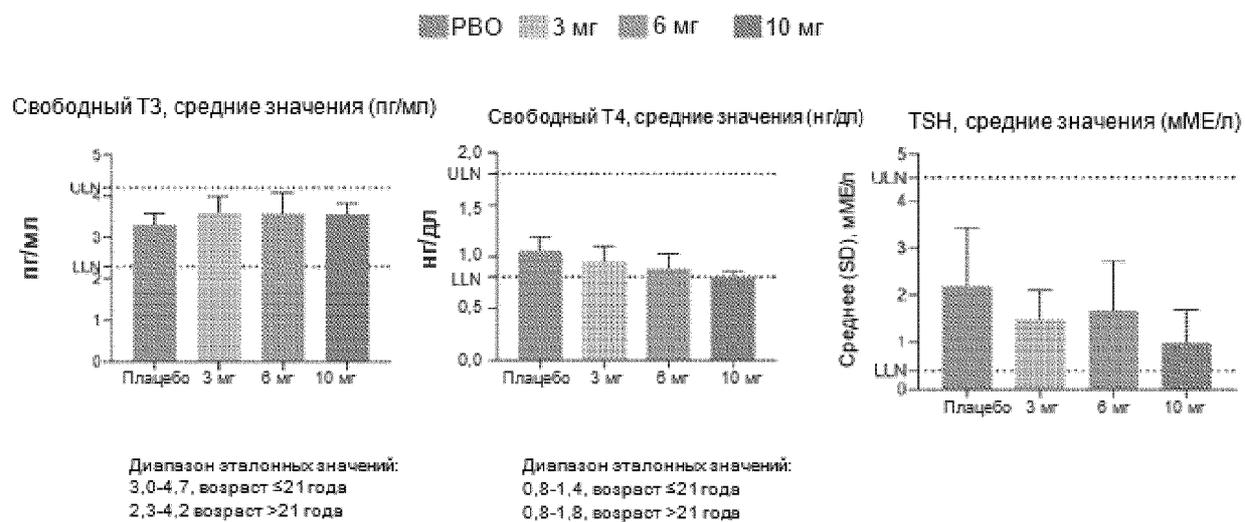
Фиг. 2



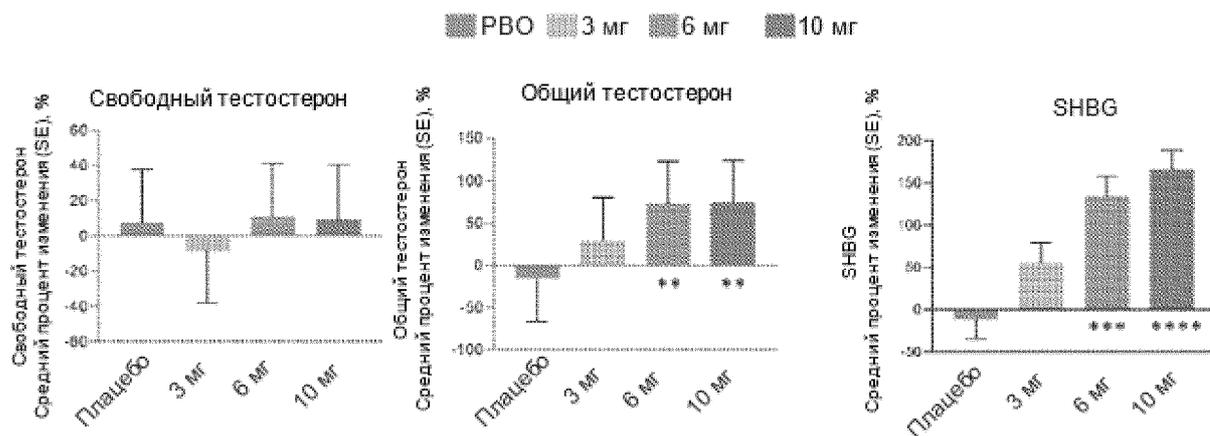
Фиг. 3



Фиг. 4

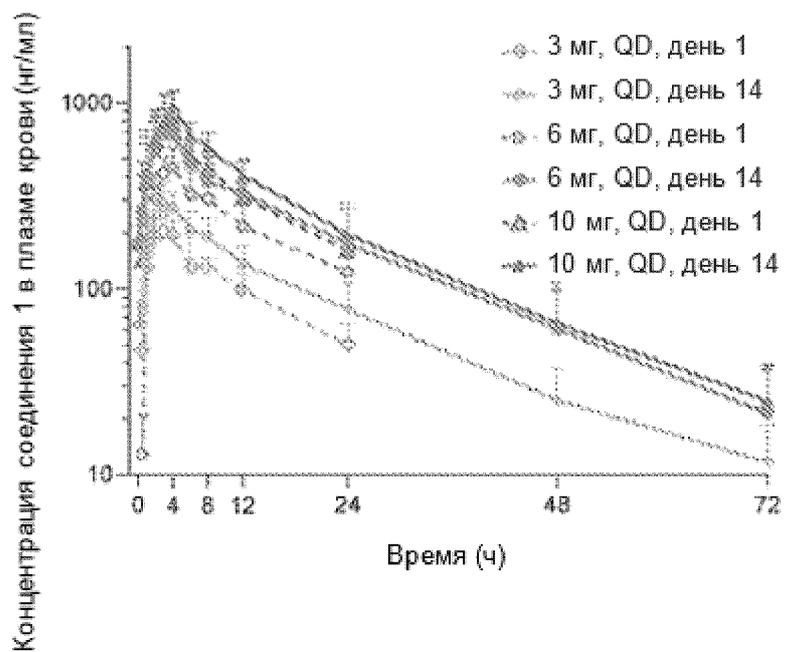


Фиг. 5

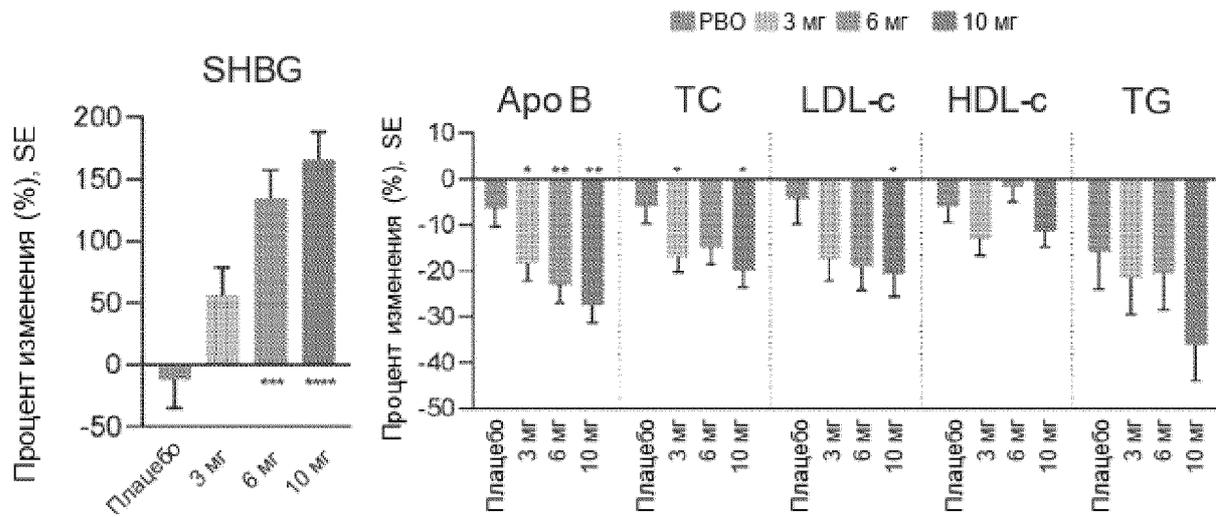


p-значение по сравнению с плацебо: **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

Фиг. 6

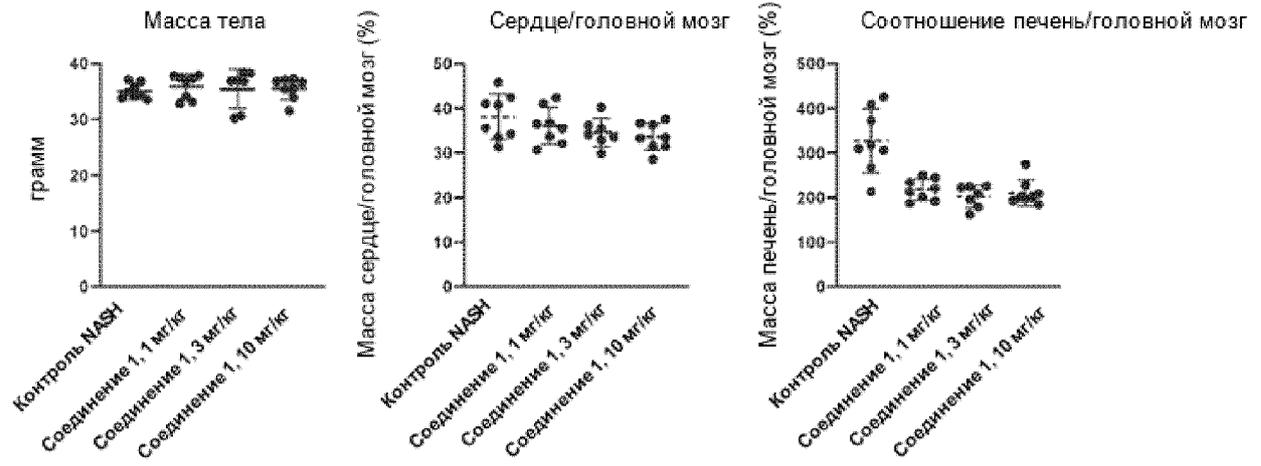


Фиг. 7

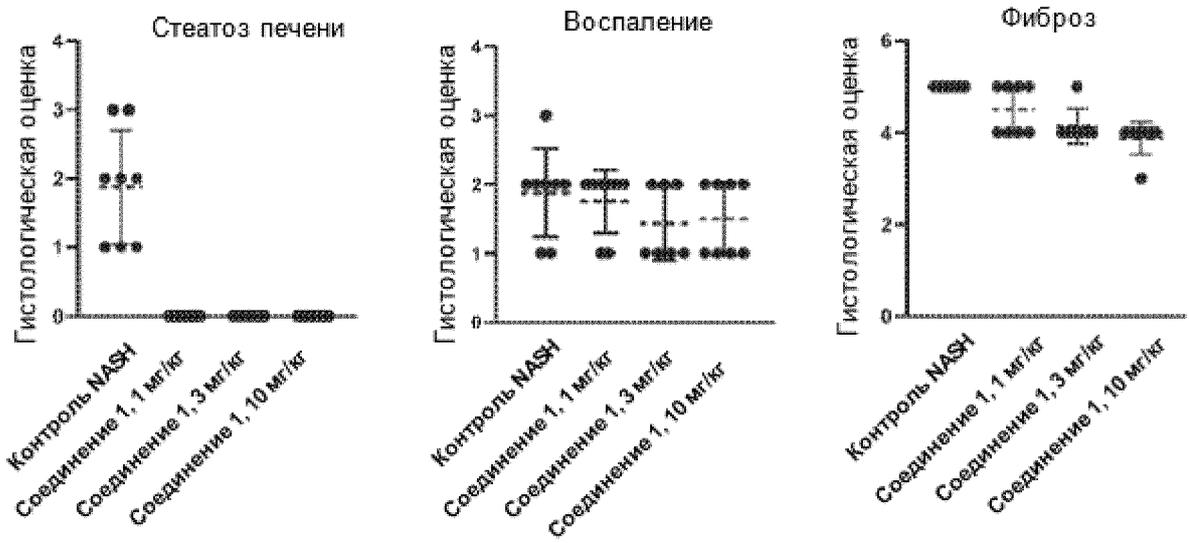


p-значение по сравнению с плацебо: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$

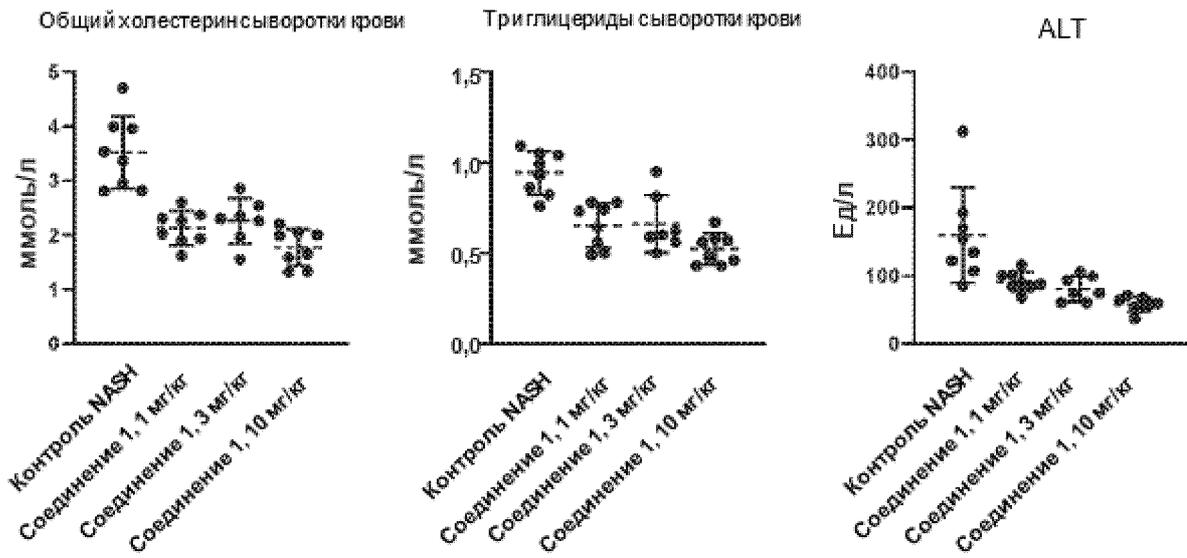
Фиг. 8



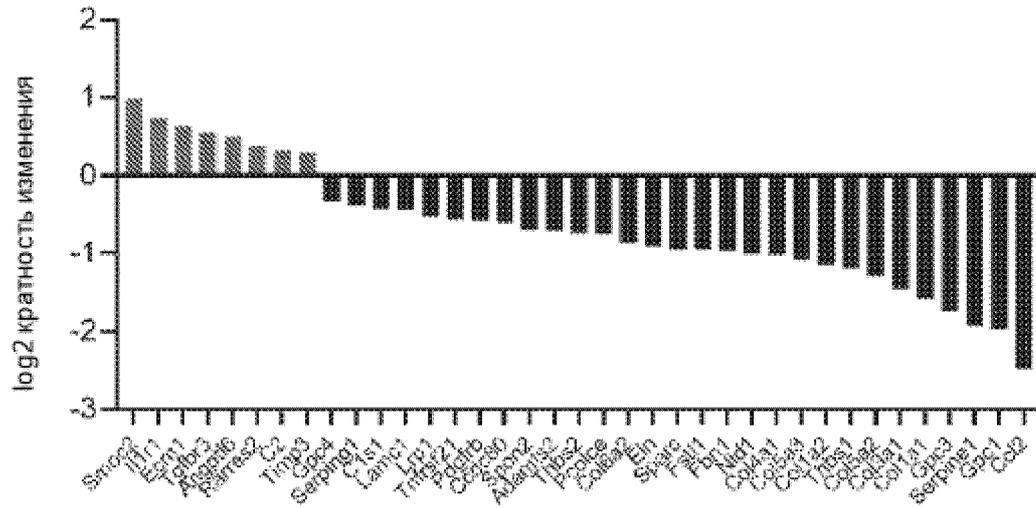
Фиг. 9



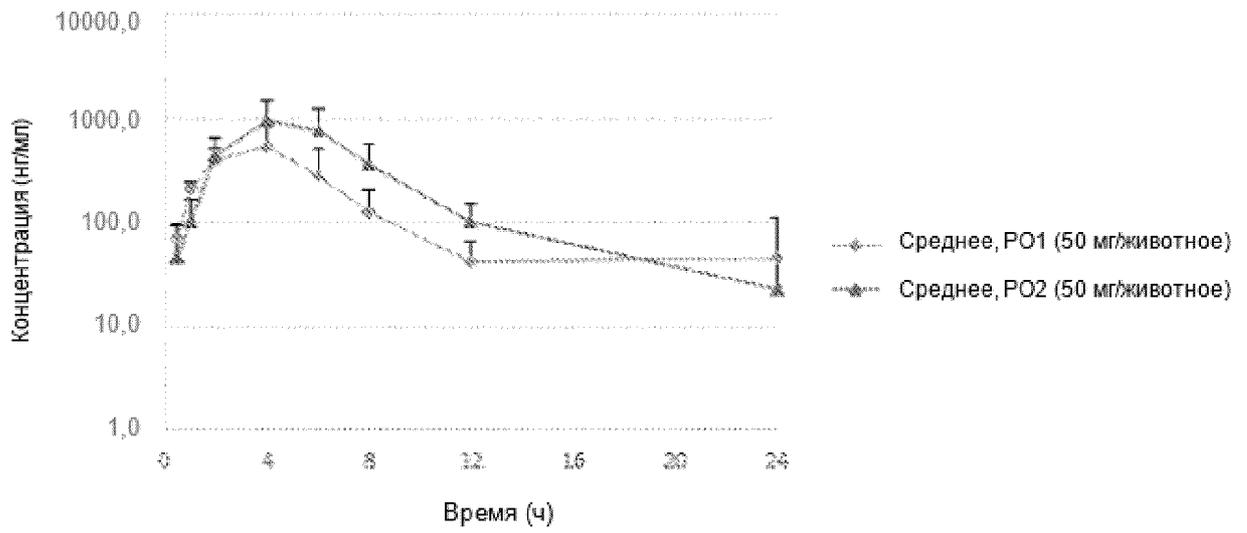
Фиг. 10



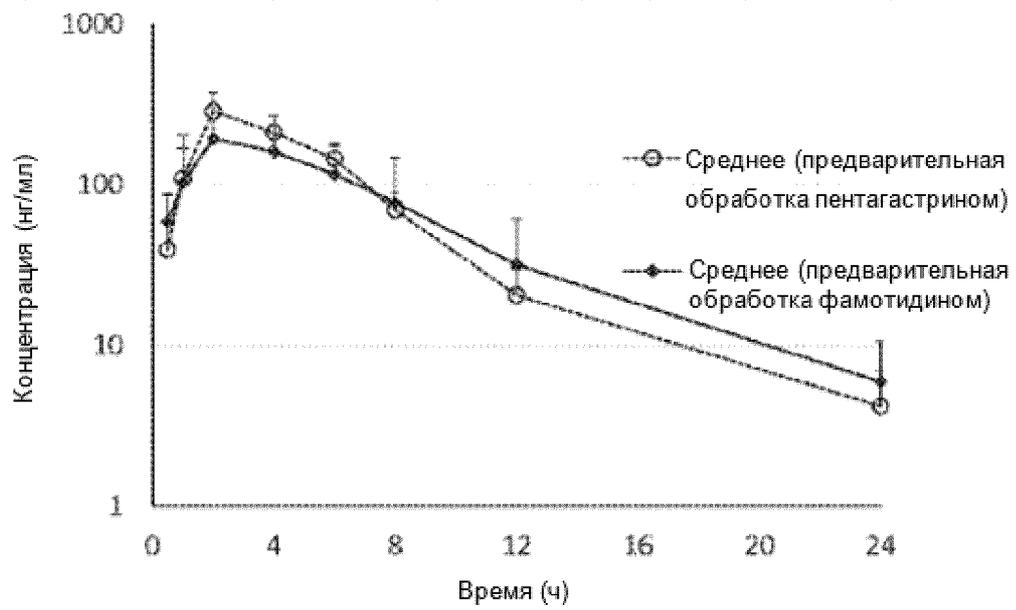
Фиг. 11



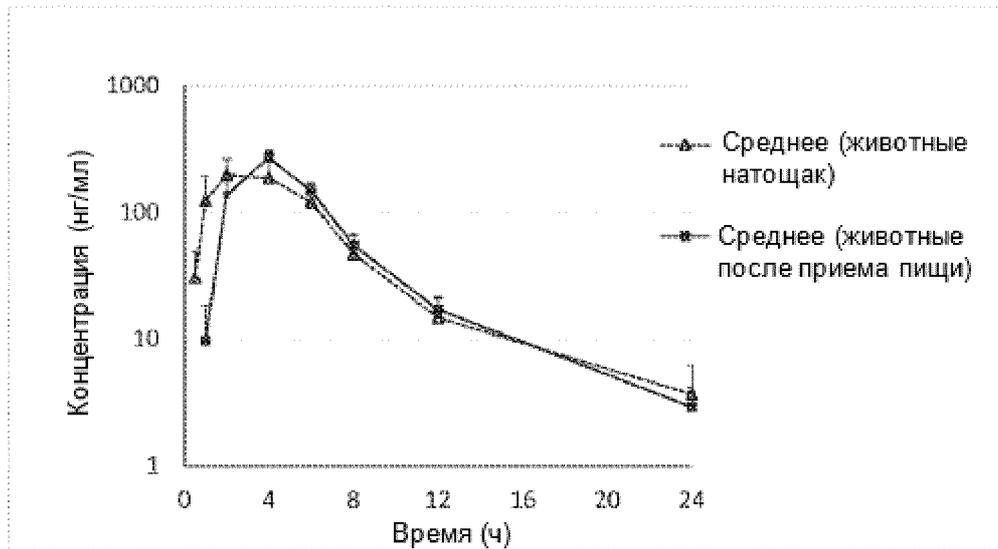
Фиг. 12



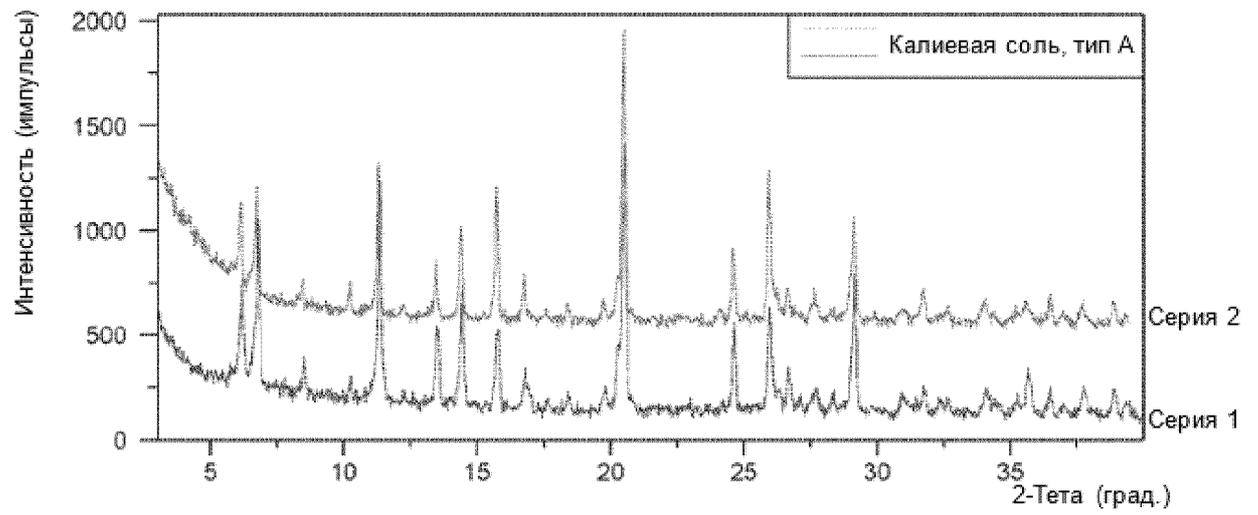
Фиг. 13



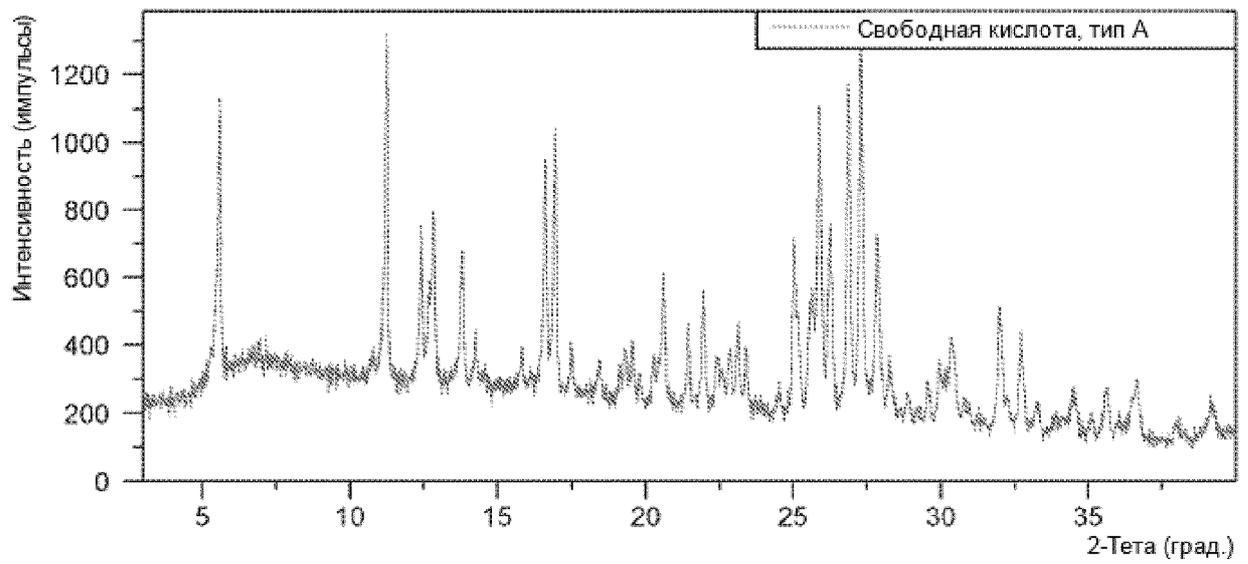
Фиг. 14



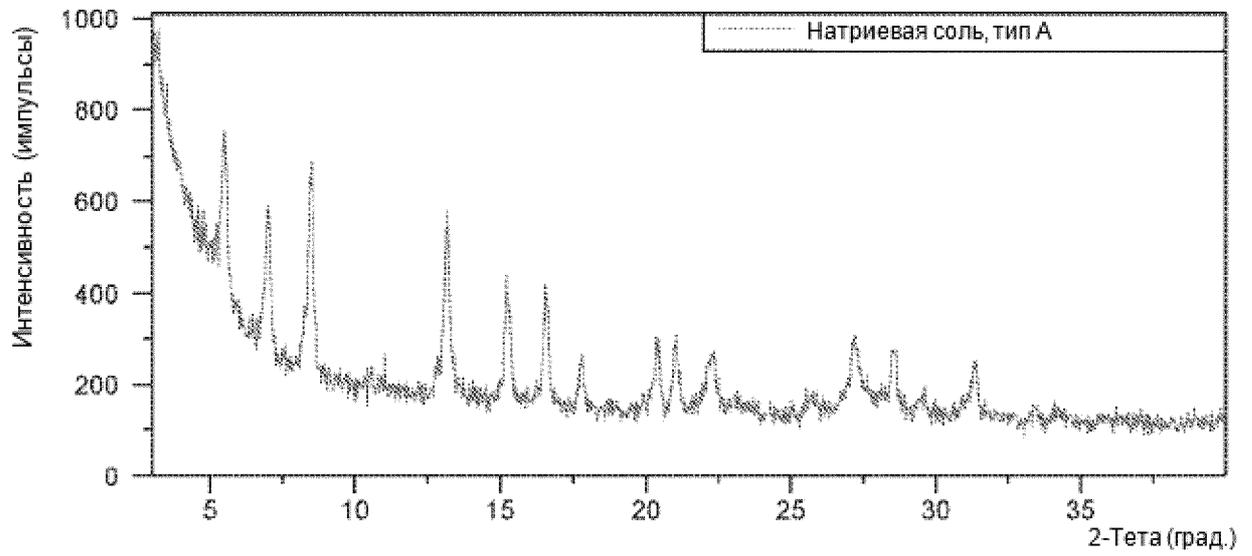
Фиг. 15



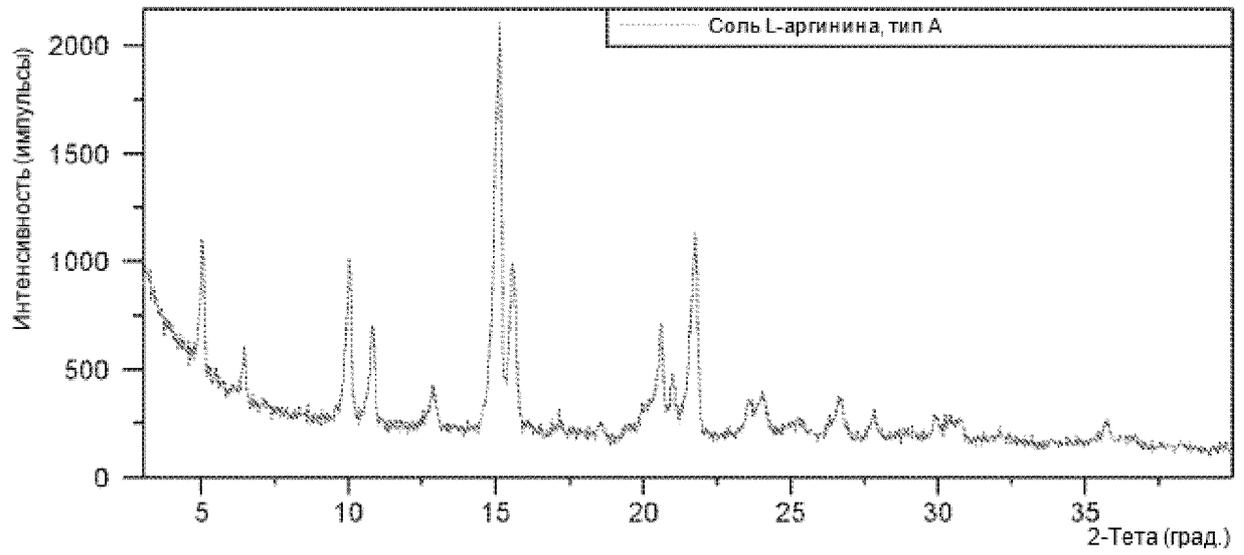
Фиг. 16



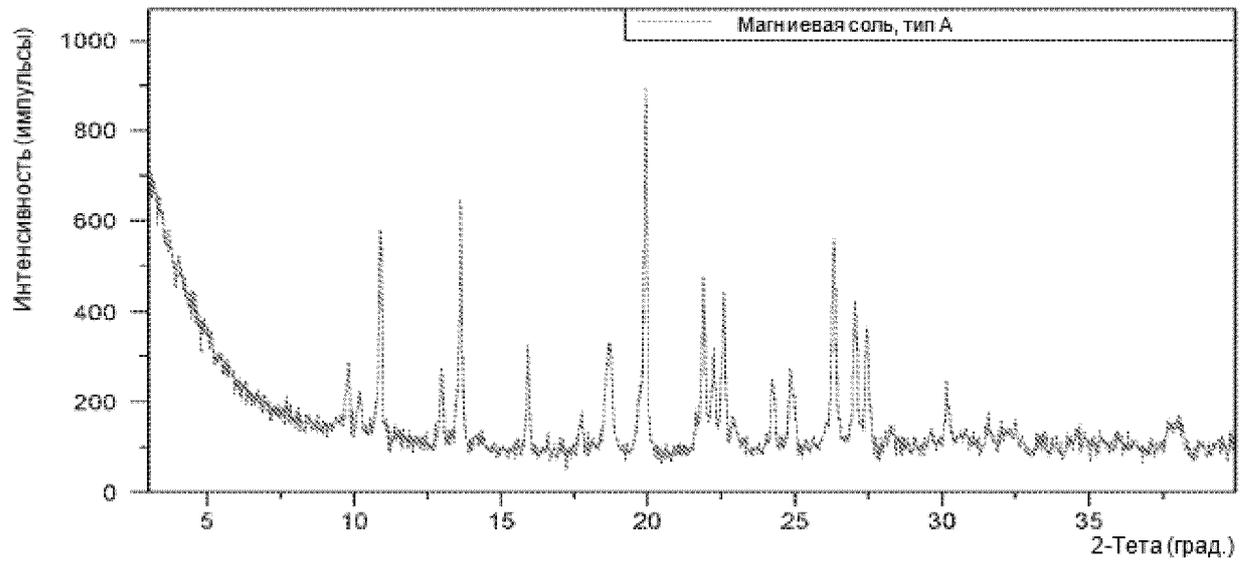
Фиг. 17



Фиг. 18

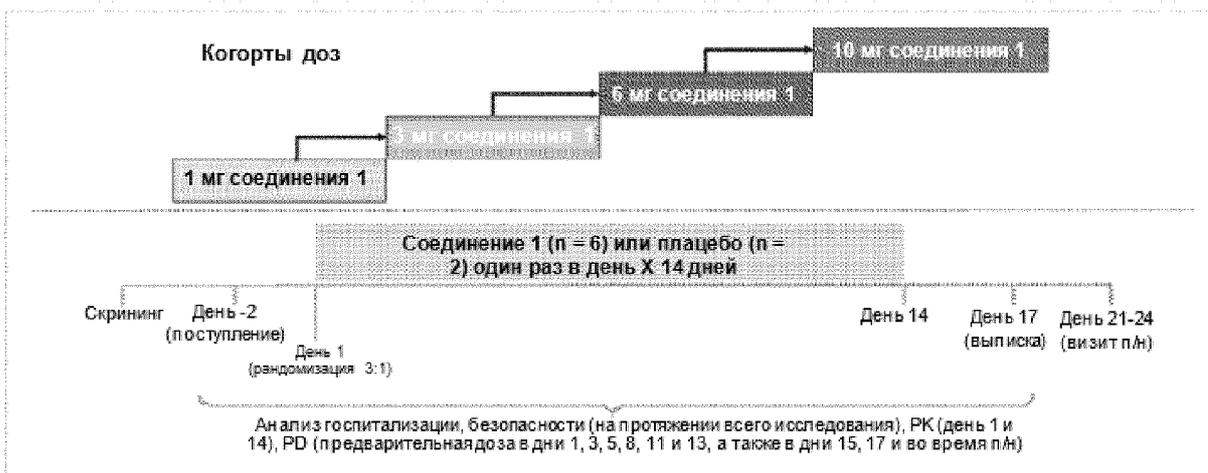


Фиг. 19



Фиг. 20

Исследуемая популяция включала здоровых взрослых (18-65 лет) с BMI 18-35 кг/м² и уровнем LDL-с натошак ≥ 100 мг/дл



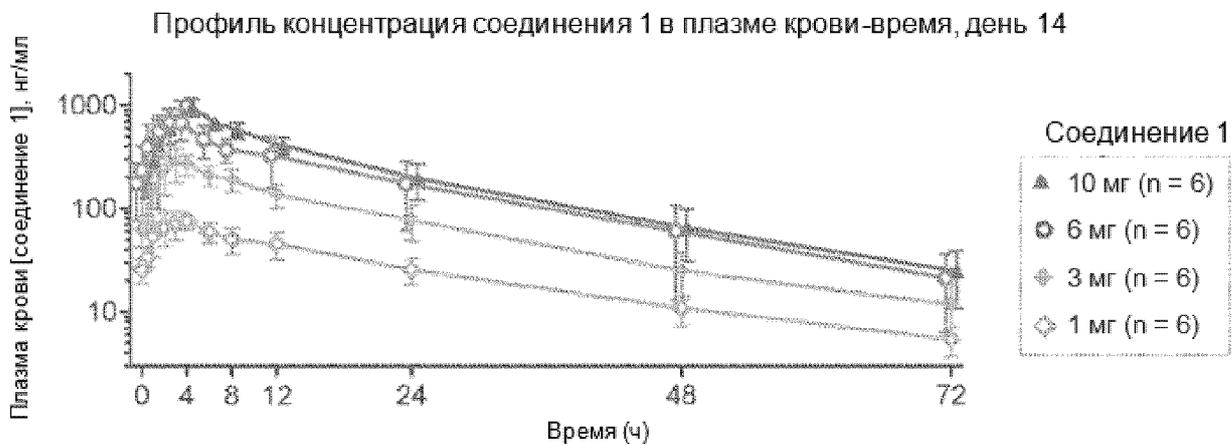
BMI, индекс массы тела; п/н, последующее наблюдение; LDL-с, холестерин липопротеинов низкой плотности; MAD, многократная возрастающая доза; PD, фармакодинамика; PK, фармакокинетика; QD, один раз в день.

Фиг. 21

Характеристики	Плацебо (N = 8)	Соединение 1			
		1 мг (N = 6)	3 мг (N = 6)	6 мг (N = 6)	10 мг (N = 6)
Возраст, среднее значение (SD) [лет]	45,9 (12,3)	44,7 (16,4)	43,3 (12,9)	44,5 (14,9)	39,5 (9,1)
Мужчины, n (%)	7 (87,5%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)
Раса, n (%)					
Белые	5 (62,5%)	6 (100%)	3 (50,0%)	6 (100%)	2 (33,3%)
Чернокожие или афроамериканцы	2 (25,0%)	0	3 (50,0%)	0	2 (33,3%)
Американские индейцы или коренные жители Аляски	0	0	0	0	2 (33,3%)
Азиаты	1 (12,5%)	0	0	0	0
Этническая принадлежность, n (%)					
Испанцы или латиноамериканцы	4 (50,0%)	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	0
BMI, среднее значение (SD) [кг/м ²]	28,6 (3,5)	28,1 (3,8)	27,1 (2,5)	26,3 (4,2)	27,0 (4,0)
АПО В, мг/дл (SD)	118,8 (26,69)	95,8 (20,17)	107,8 (12,83)	100,3 (39,83)	104,8 (12,25)
LDL-с, среднее значение (SD) [мг/дл]	149,1 (32,2)	121,5 (31,3)	131,8 (13,5)	120,0 (49,8)	126,7 (15,9)
ТС, мг/дл (SD)	222,5 (41,35)	187,3 (41,38)	209,7 (13,05)	188,0 (61,99)	197,2 (15,54)
TG, мг/дл (SD)	125,8 (63,73)	112,0 (36,39)	107,7 (50,61)	123,8 (77,41)	116,3 (63,68)
SHBG, среднее значение (SD) [нмоль/л]	28,0 (6,8)	39,8 (17,9)	42,2 (11,0)	38,8 (15,1)	33,3 (19,1)

BMI, индекс массы тела; LDL-с, холестерин липопротеинов низкой плотности; SHBG, глобулин, связывающий половые гормоны; АПО-В, аполипопротеин В; TG, триглицериды; ТС, общий холестерин; SD, стандартное отклонение

Фиг. 22



- Вариабельность PK в целом была низкой (% CV от 16 до 44% для AUC_{0-72} и C_{max})
- Период полувыведения соединения 1 (в среднем от 15 до 21 ч) поддерживает дозировку один раз в день

Фигура. Данные представлены как среднее значение (SD)
 AUC_{0-72} , площадь под кривой концентрация-время от момента времени 0 до конца периода введения дозы; ч, час; PK, фармакокинетика

Фиг. 23

PK параметр в день 14	Соединение 1			
	1 мг QD n = 6	3 мг QD n = 6	6 мг QD, n = 6	10 мг QD, n = 6
AUC ₀₋₂₄ (ч•нг/мл)	1090 (15,7)	3600 (26,9)	8310 (44,4)	10600 (21,1)
C _{max} (нг/мл)	80,3 (20,0)	291 (30,9)	699 (35,1)	996 (18,0)
t _{1/2} (ч)	21,3 (17,0-23,8)	17,1 (15,3-19,6)	16,4 (12,7-17,6)	15,4 (13,1-18,5)

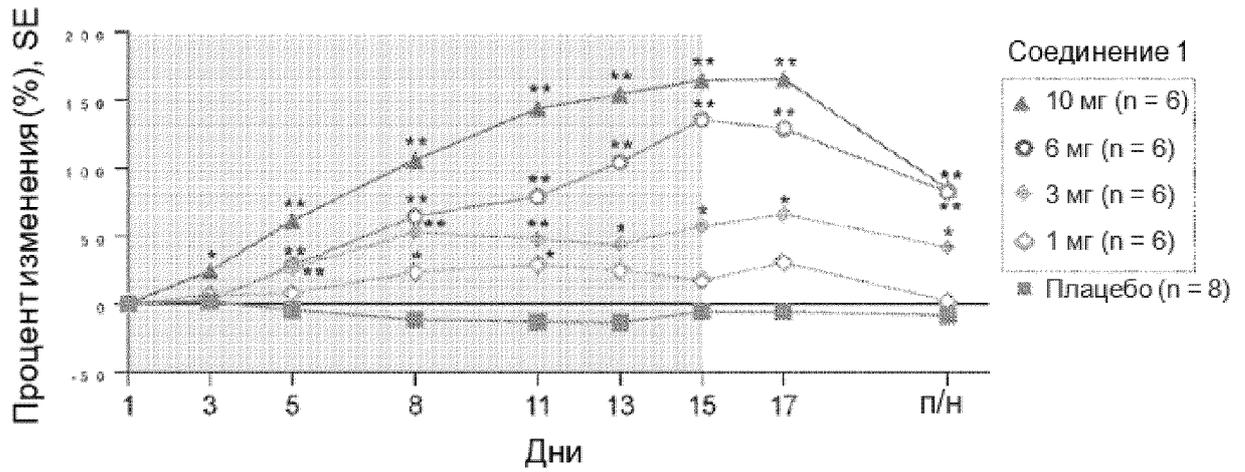
AUC₀₋₂₄, площадь под кривой концентрация-время от момента времени 0 до конца периода введения дозы; C_{max}, максимальная наблюдаемая концентрация; CV, коэффициент вариации; ч, час; PK, фармакокинетика; QD, один раз в день;

t_{1/2}, конечный период полувыведения.

Параметры представлены с 3 значащими цифрами как средние значения (% CV), за исключением t_{1/2}, который представлен как медиана (диапазон).

Фиг. 24

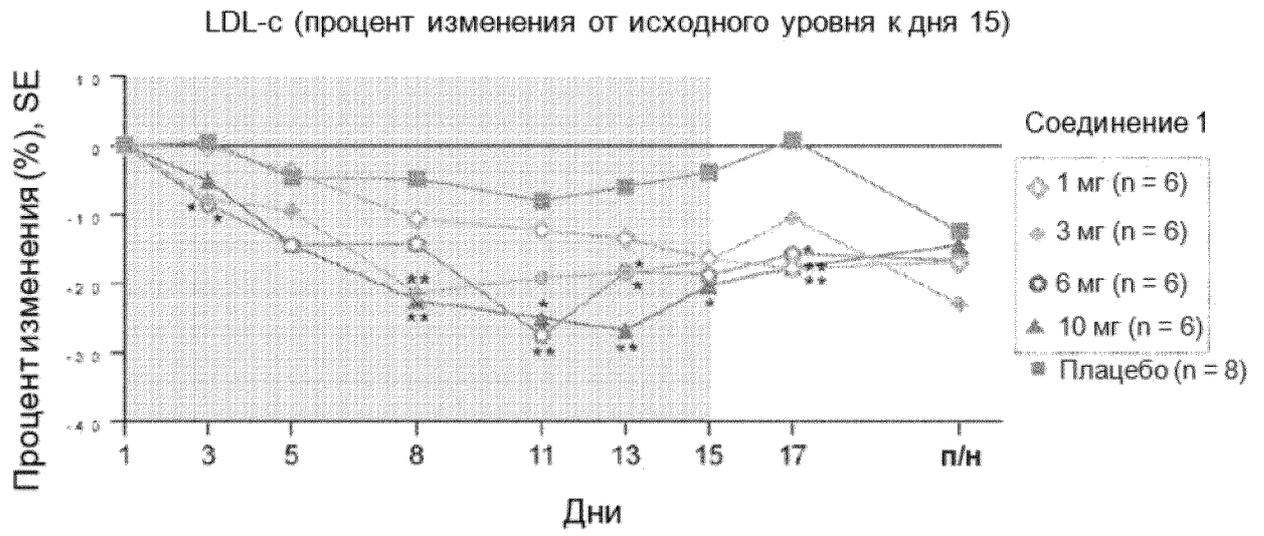
SHBG (процент изменения от исходного уровня до дня 15)

p-значения по сравнению с плацебо: * $<0,05$; ** $<0,01$

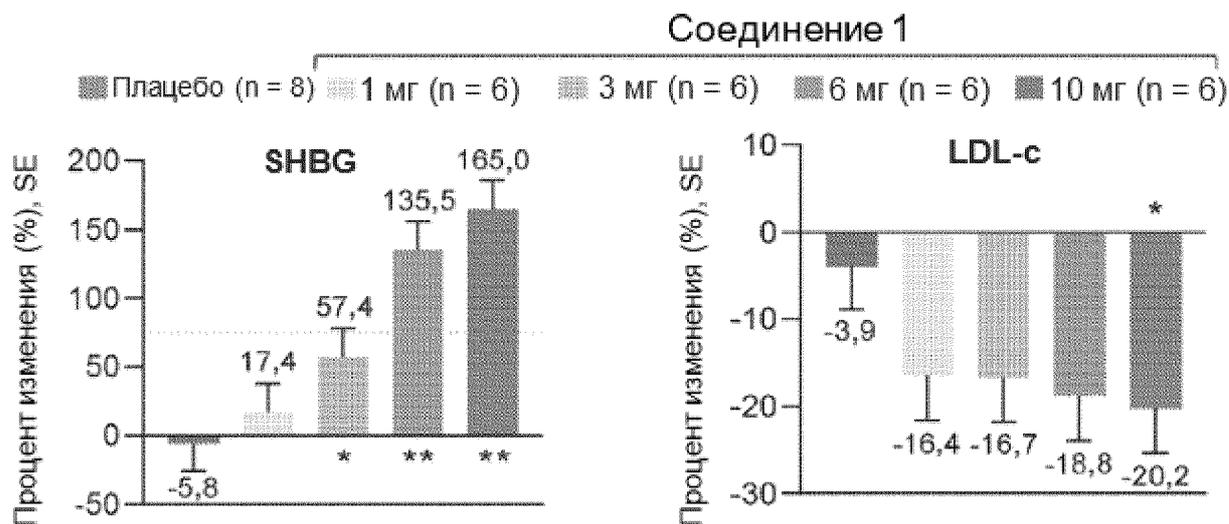
Средний процент изменения относится к LSM на основе модели ANCOVA и SE

ANCOVA, ковариационный анализ; п/н, последующее наблюдение; LSM, среднее значение на основе метода наименьших квадратов; SE, стандартная ошибка; SHBG, глобулин, связывающий половые гормоны

Фиг. 25



Фиг. 26



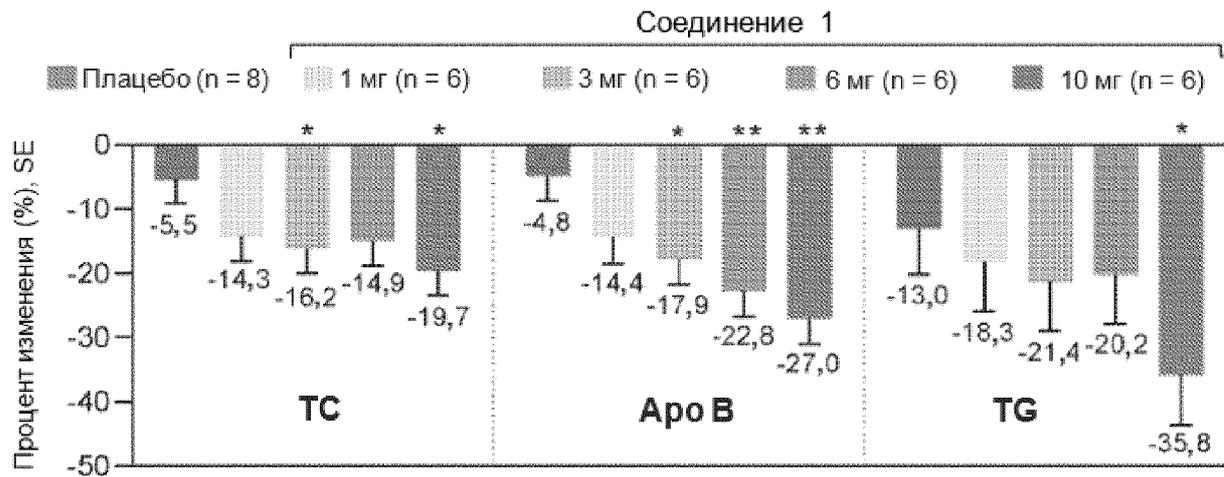
p-значение по сравнению с плацебо: * $<0,05$; ** $<0,01$

Средний процент изменения относится к LSM на основе модели ANCOVA и SE

ANCOVA, анализ ковариации; Apo B, ап олипопротеин B; LDL-c, холестерин липопротеинов низкой плотности;

LSM, среднее значение на основе метода наименьших квадратов; PD, фармакодинамика; SE, стандартная ошибка; SHBG, глобулин, связывающий половые гормоны; TC, общий холестерин; TG, триглицериды

Фиг. 27



• Значимых изменений уровня холестерина HDL не наблюдалось.

p-значение по сравнению с плацебо: * $<0,05$; ** $<0,01$

Средний процент изменения относится к LSM на основе модели ANCOVA и SE

ANCOVA, ковариационный анализ; Apo B, аполипопротеин B; LDL-c, холестерин липопротеинов низкой плотности; LSM, среднее значение на основе метода наименьших квадратов; PD, фармакодинамика; SE, стандартная ошибка; SHBG, глобулин, связывающий половые гормоны; TC, общий холестерин; TG, триглицериды

Фиг. 28

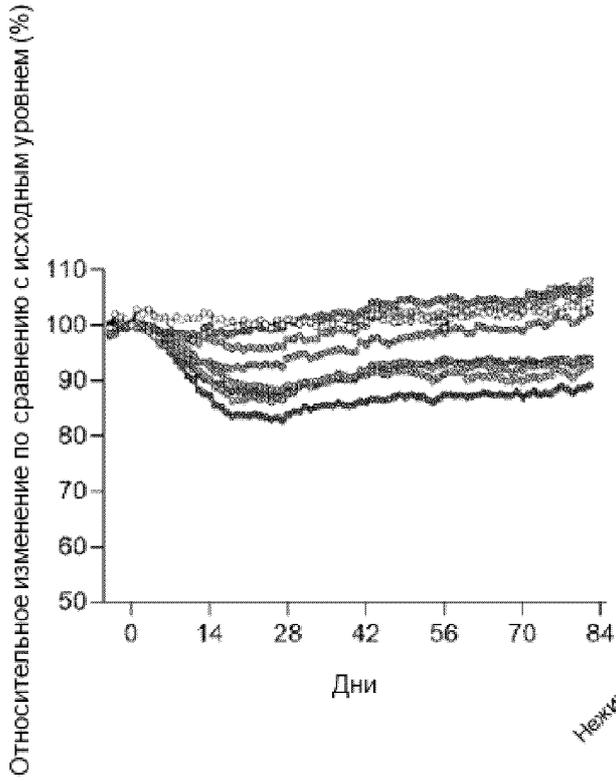
Частота возникновения АЕ у субъектов по категориям, n (%)	Плацебо (n = 8)	Соединение 1			
		1 мг (n = 6)	3 мг (n = 6)	6 мг (n = 6)	10 мг (n = 6)
Любые АЕ, все степени СТСАЕ	1 (12,5%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)
СТСАЕ степени 1	1 (12,5%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)
СТСАЕ степени 2 или выше	0	0	0	0	0
Серьезные АЕ	0	0	0	0	0
АЕ в зависимости от отношения к лекарственному средству					
Не связано	1 (12,5%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	0	2 (33,3%)
Связь маловероятна	0	1 (16,7%)	0	0	0
Связь возможна	0	0	0	1 (16,7%)*	0
Связано	0	0	0	0	0

- Частота сердечных сокращений и артериальное давление в группах лечения оставались в целом стабильными, клинически значимых изменений не наблюдалось
- Значимых изменений в параметрах ЭКГ не наблюдалось

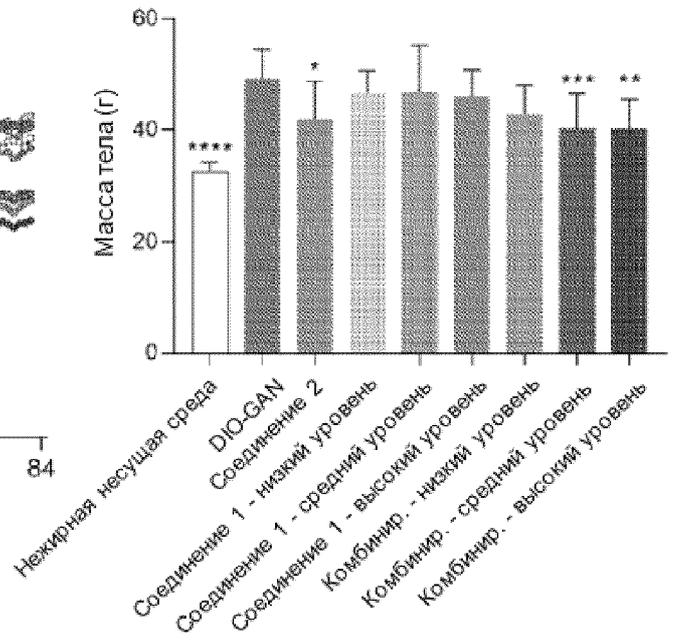
* У одного субъекта сообщалось о головокружении.

АЕ, нежелательное явление; СТСАЕ, общие терминологические критерии нежелательных явлений; ЭКГ, электрокардиограмма.

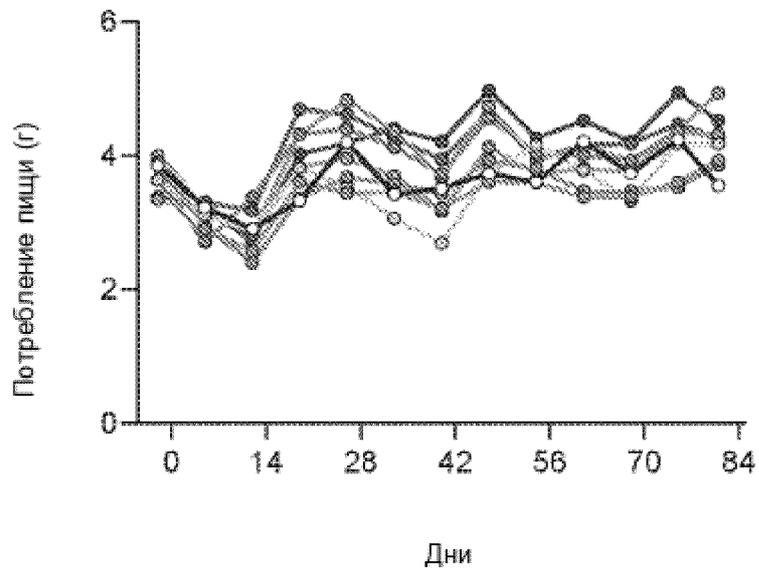
Фиг. 29



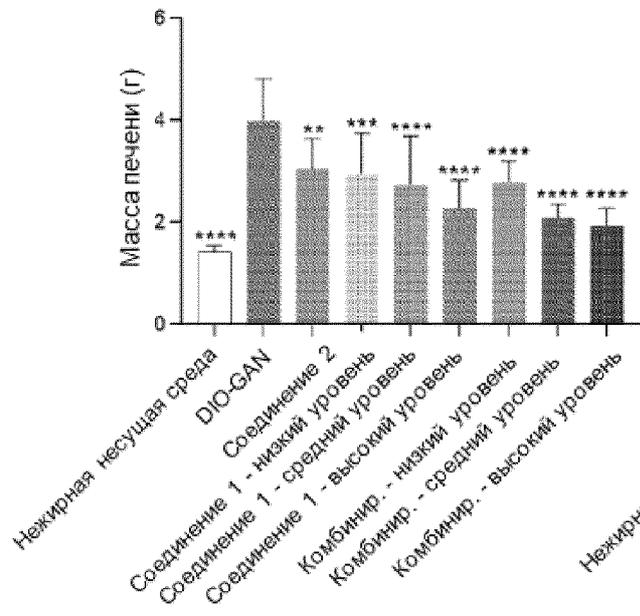
Фиг. 30А



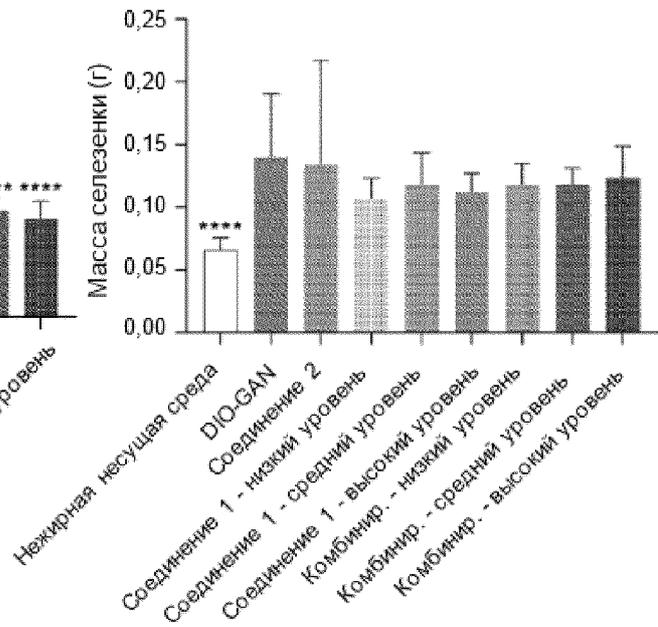
Фиг. 30В



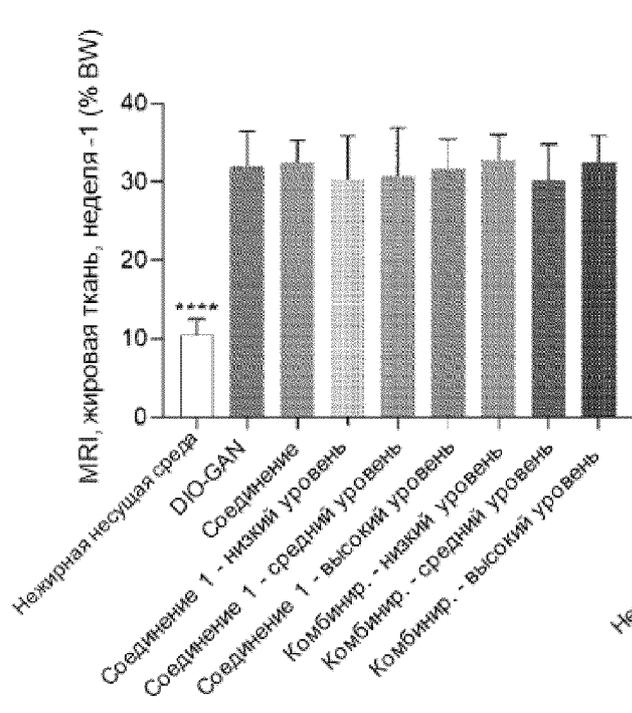
Фиг. 31



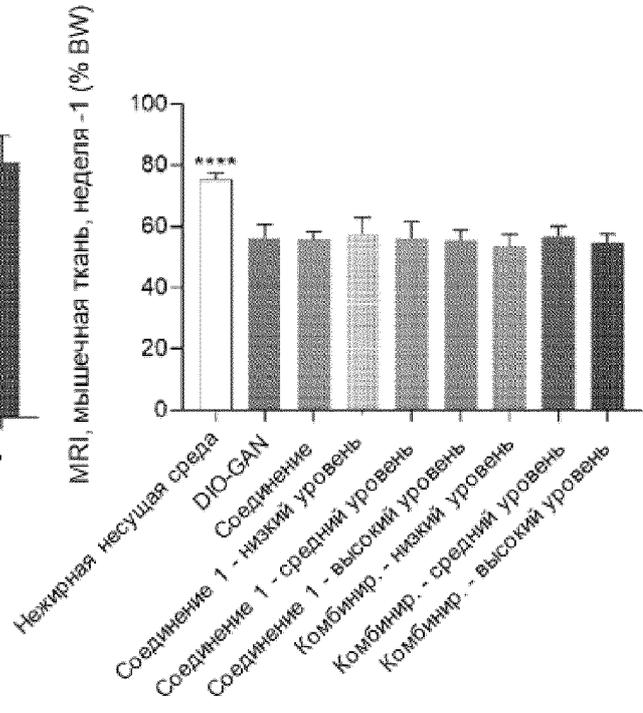
Фиг. 32А



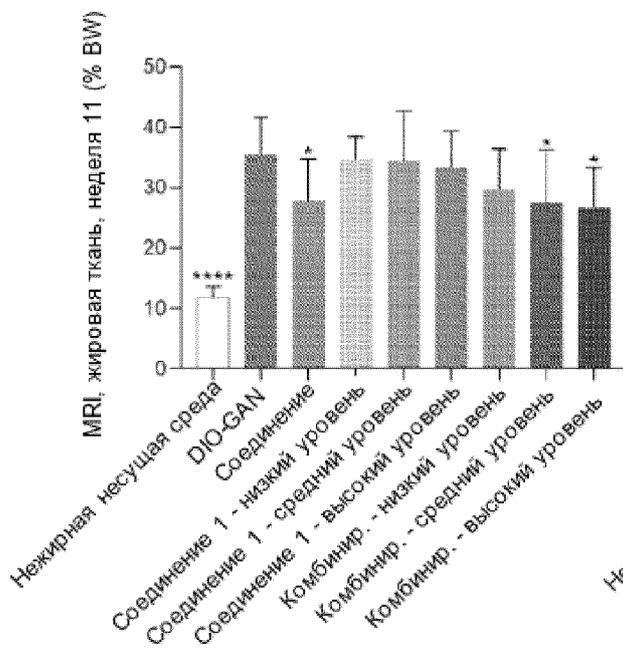
Фиг. 32В



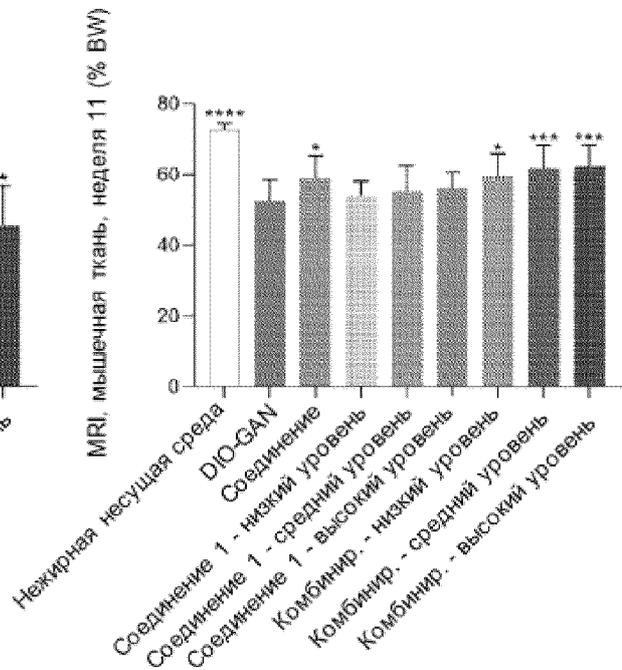
Фиг. 33А



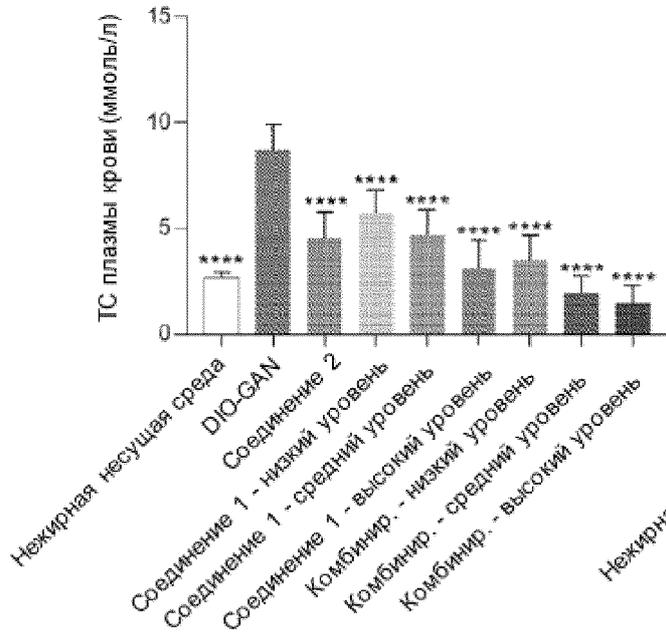
Фиг. 33В



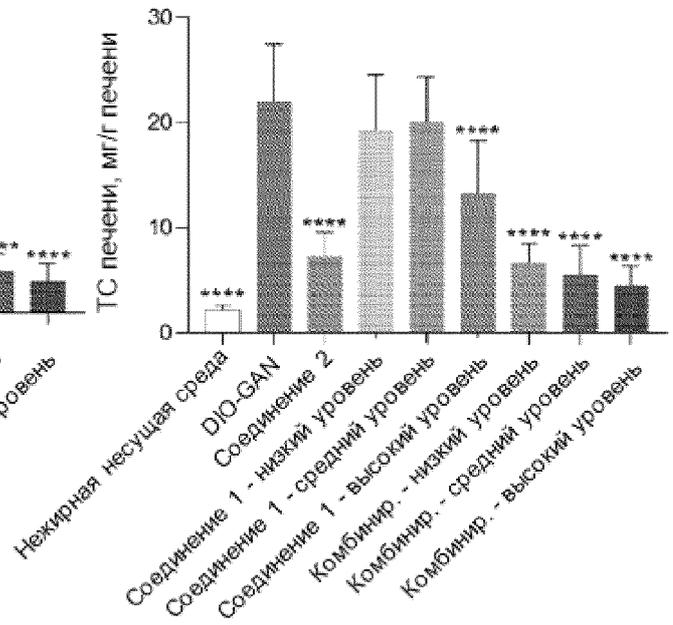
Фиг. 34А



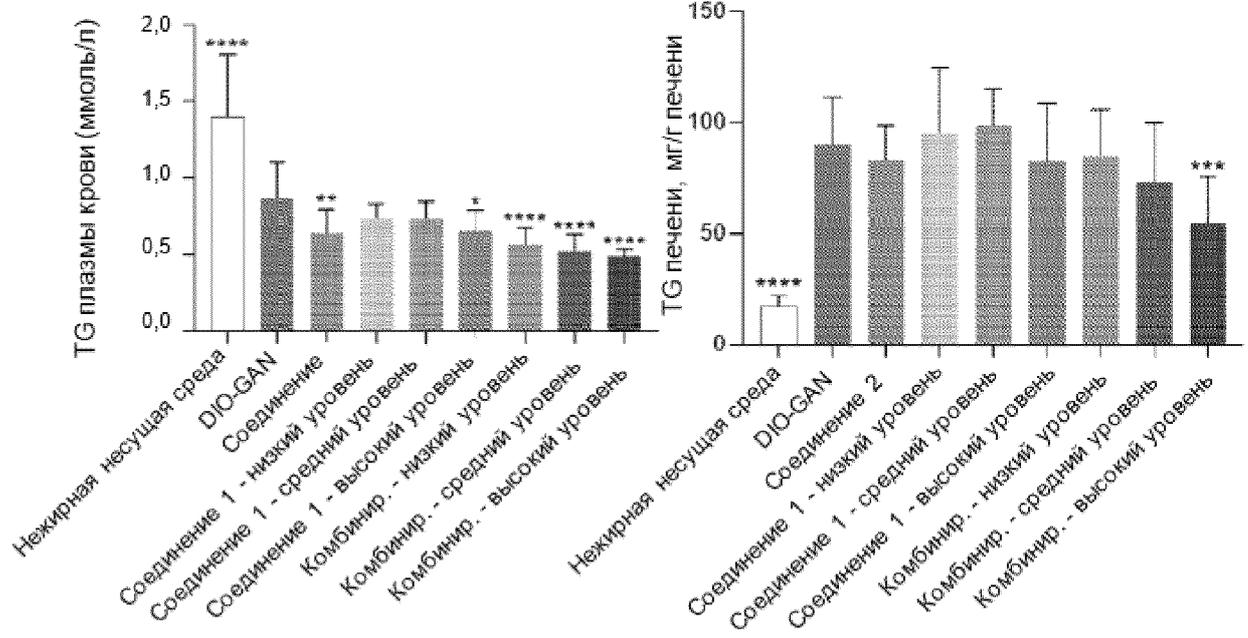
Фиг. 34В



Фиг. 35А

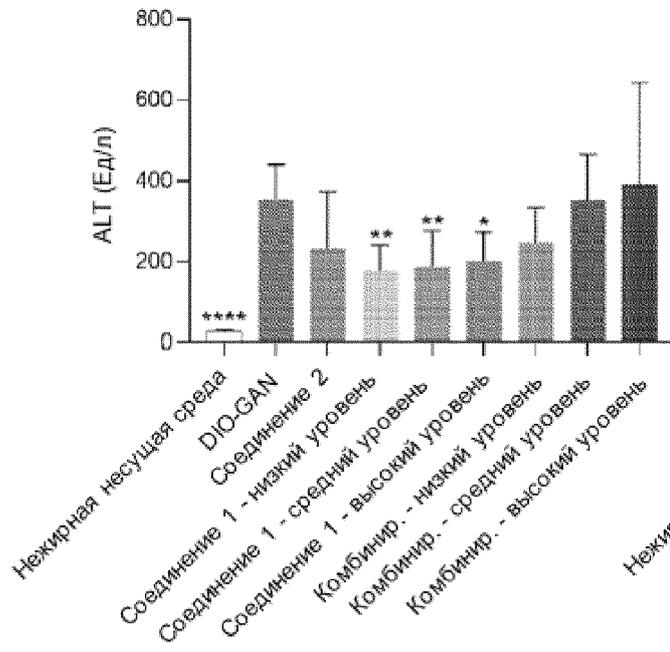


Фиг. 35В

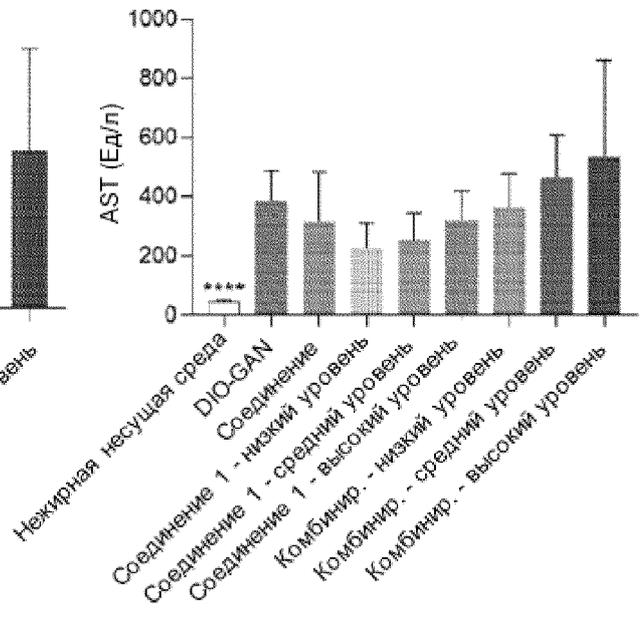


Фиг. 36А

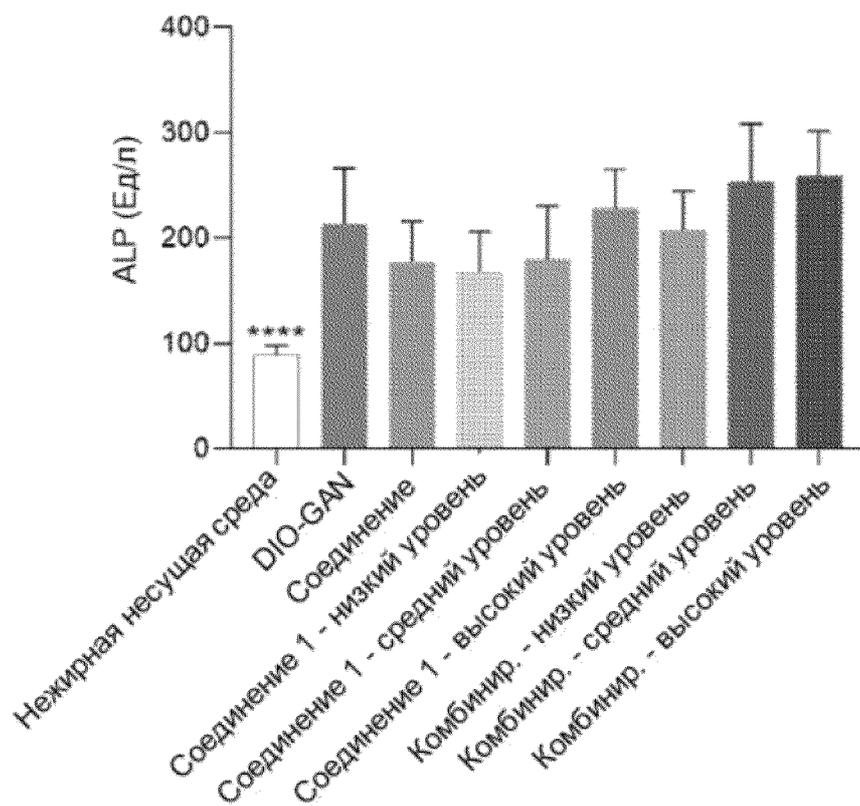
Фиг. 36В



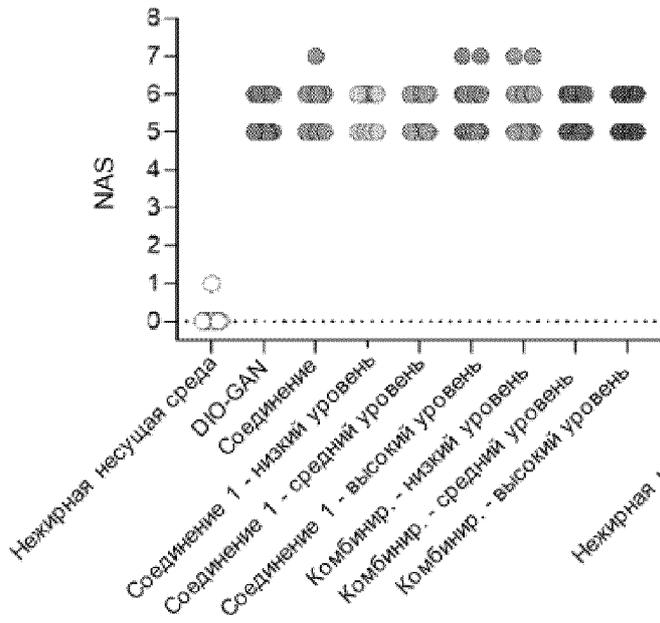
Фиг. 37А



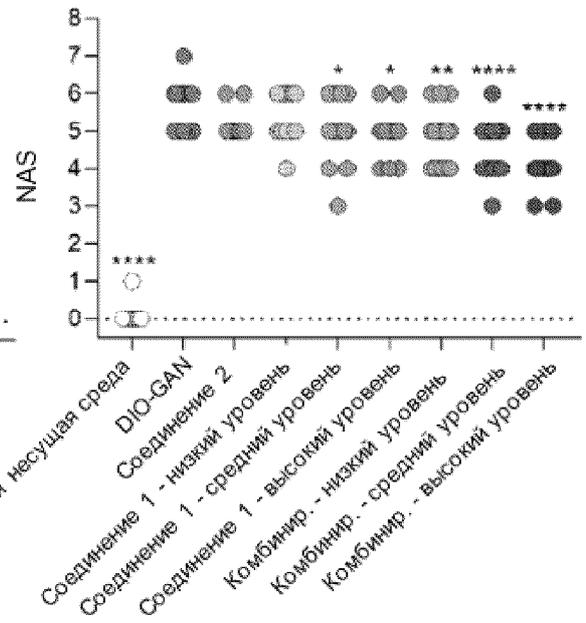
Фиг. 37В



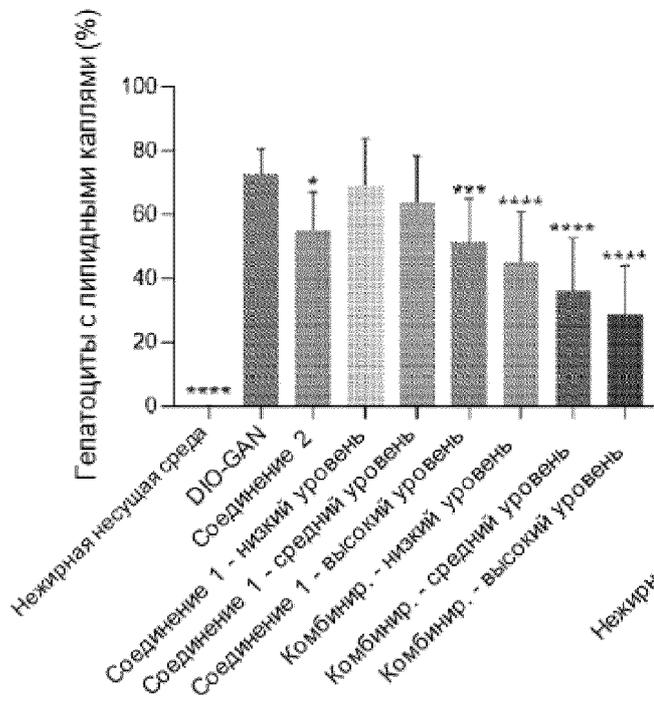
Фиг. 38



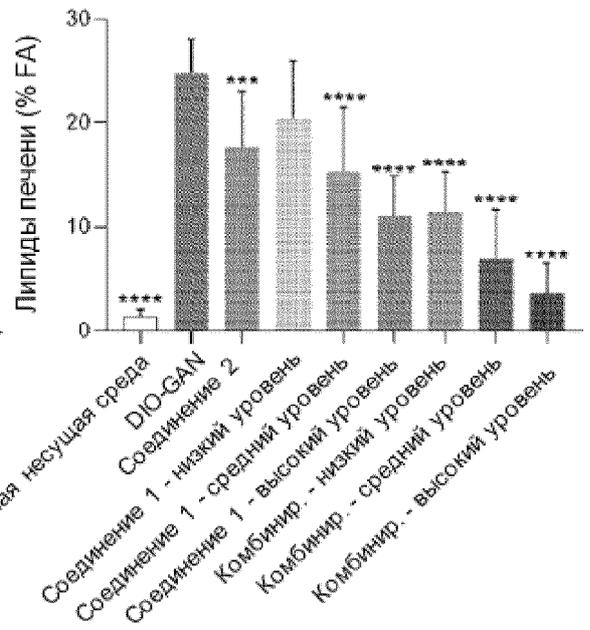
Фиг. 39А



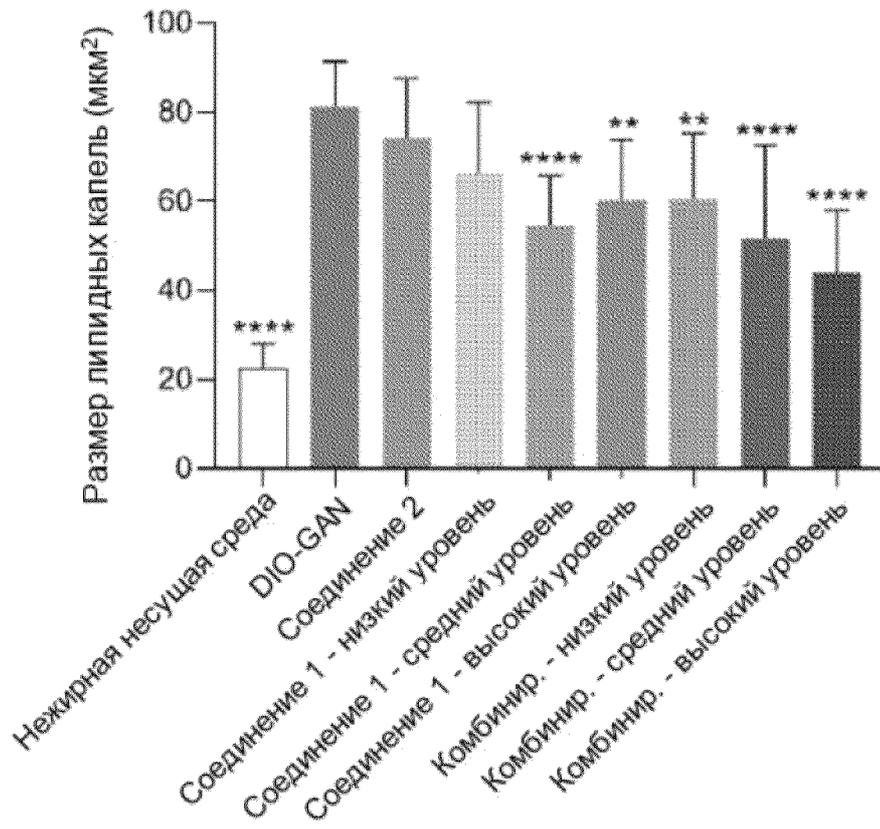
Фиг. 39В



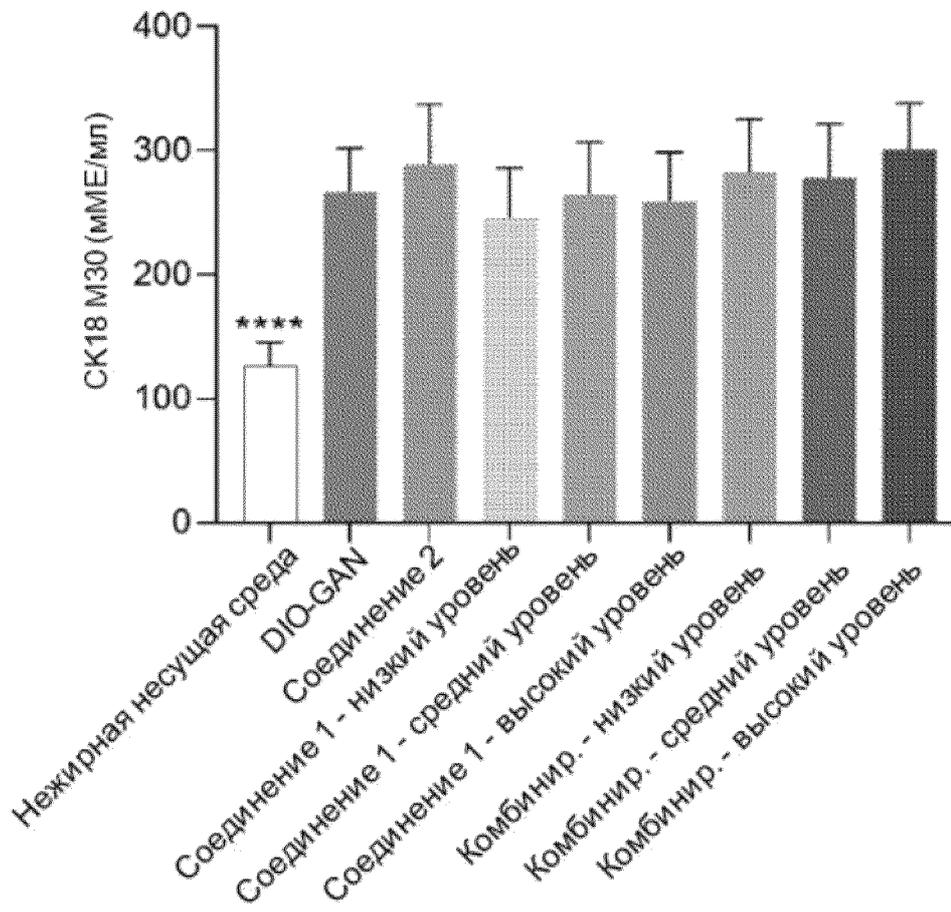
Фиг. 40А



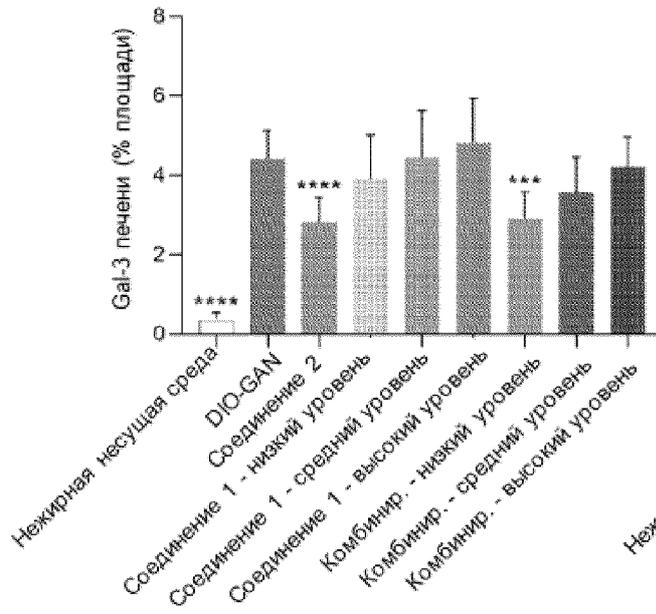
Фиг. 40В



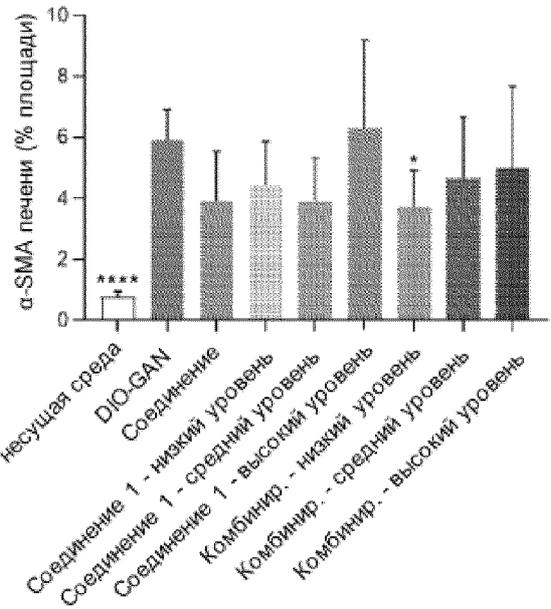
Фиг. 41



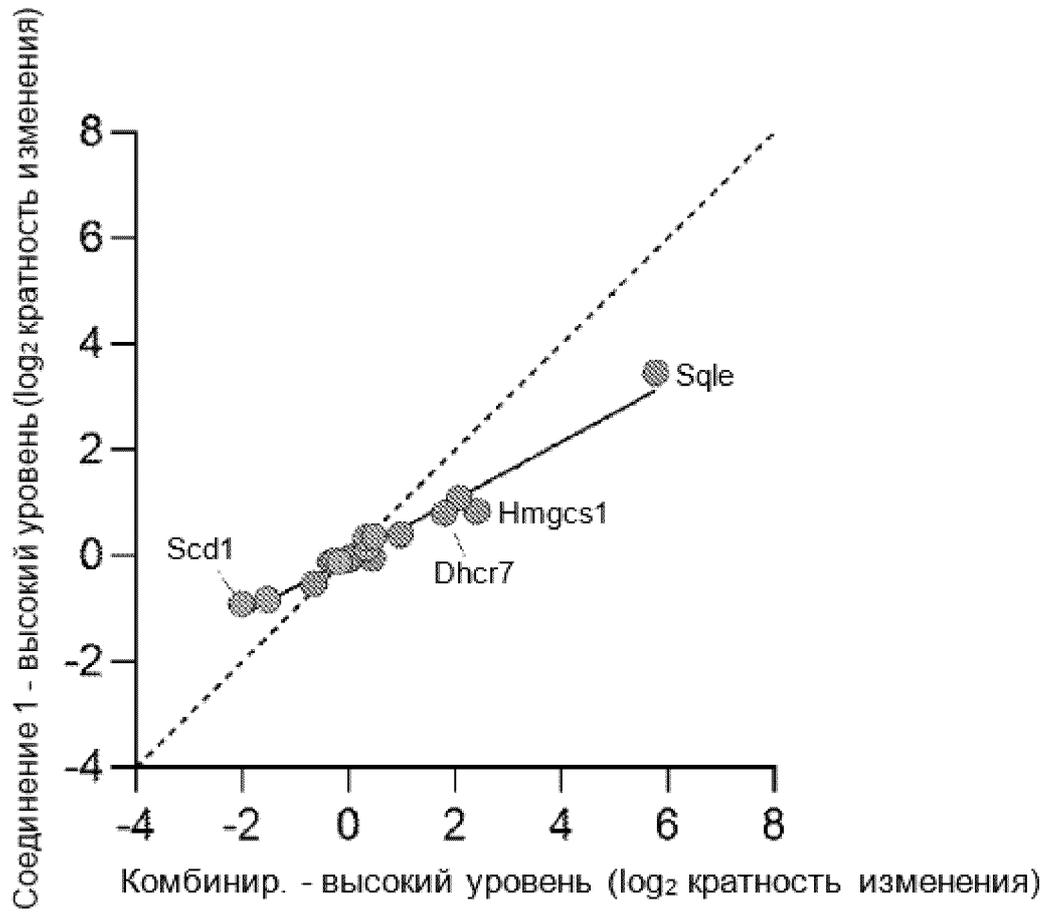
Фиг. 42



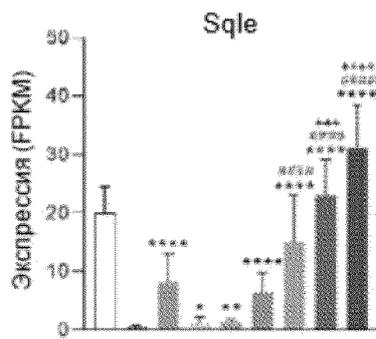
Фиг. 43А



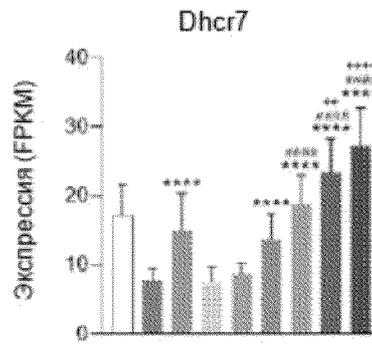
Фиг. 43В



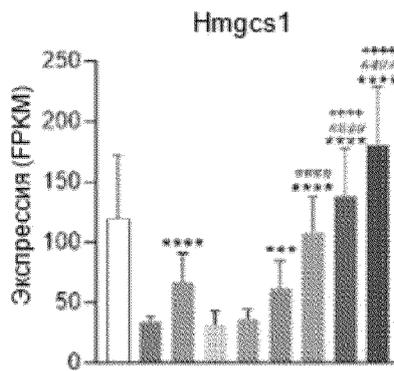
Фиг. 44



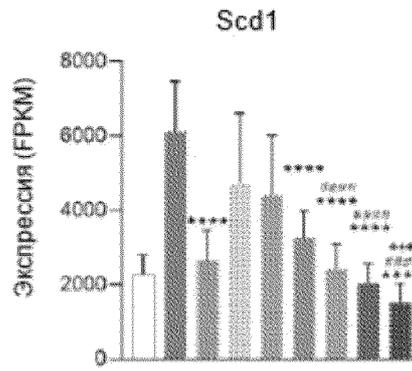
Фиг. 45А



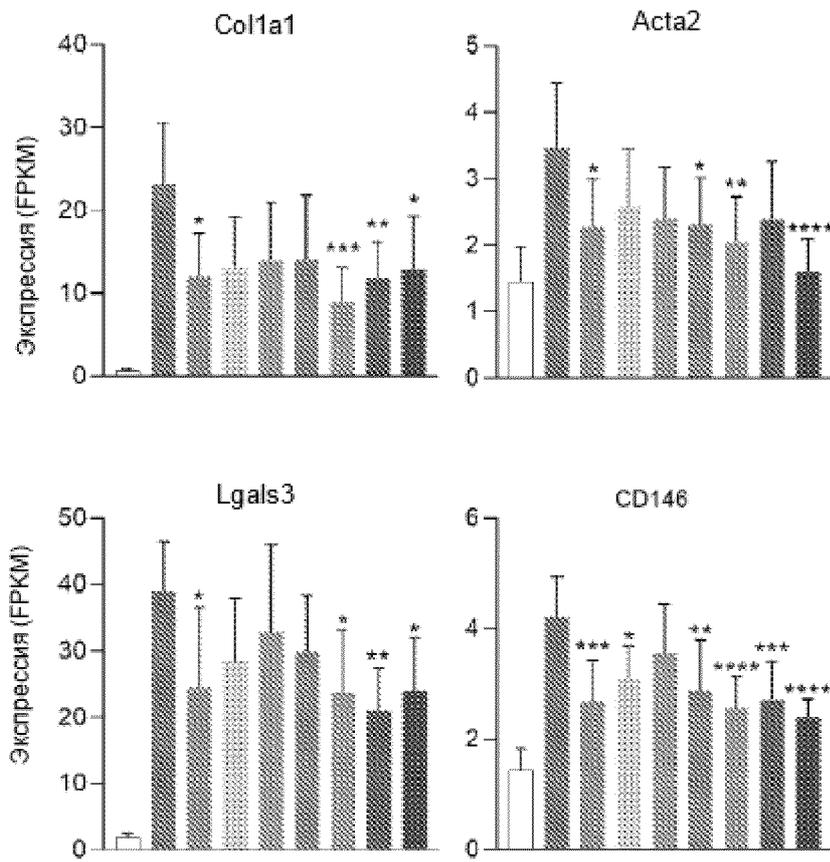
Фиг. 45В



Фиг. 45С



Фиг. 45D



Фиг. 46