

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044618**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.15

(21) Номер заявки
201991866

(22) Дата подачи заявки
2018.02.21

(51) Int. Cl. *A61K 31/192* (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) **КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗНОГО ИЛИ ХОЛЕСТАТИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

(31) 17157279.5; 17162161.8; 17165131.8

(32) 2017.02.21; 2017.03.21; 2017.04.05

(33) EP

(43) 2020.01.30

(86) PCT/EP2018/054305

(87) WO 2018/153933 2018.08.30

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

(72) Изобретатель:
**Нозль Бенуа, Вальчак Роберт,
Беланже Кароль (FR)**

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

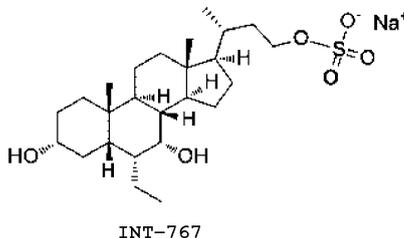
(56) WO-A1-2016154258
US-A1-2006252670

RATZIU VLAD: "Novel Pharmacotherapy Options for NASH", DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 61, № 5, 22 March 2016 (2016-03-22), p. 1398-1405, XP035905940, ISSN: 0163-2116, DOI: 10.1007/S10620-016-4128-Z [retrieved on 2016-03-22], abstract

WO-A2-2016127019

ANNA BAGHDASARYAN ET AL.: "Dual farnesoid X receptor/TGR5 agonist INT-767 reduces liver injury in the Mdr2 ^{-/-} (Abcb4 ^{-/-}) mouse cholangiopathy model by promoting biliary HCO₃⁻ output", HEPATOLOGY, vol. 54, № 4, 27 September 2011 (2011-09-27), p. 1303-1312, XP055466254, US, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/hep.24537, abstract

(57) Изобретение относится к комбинированному продукту для лечения фиброзного или холестатического заболевания, содержащему (i) элафибранор (ELA) или его фармацевтически приемлемую соль; и (ii) агонист FXR, выбранный из обетихоловой кислоты (OCA) или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения указанной ниже структурной формулы (INT-767) или его фармацевтически приемлемой соли. Предложен также способ лечения фиброзного или холестатического заболевания, включающий введение указанного комбинированного продукта нуждающемуся в этом субъекту.



044618
B1

044618
B1

Уровень техники для изобретения

Согласно Washington Manual of Medical Therapeutics (31st ed., 2004, Lippincott Williams & Wilkins) нарушения печени можно разделить на различные группы заболеваний, в частности вирусные заболевания, связанные с наркотическими веществами или алкоголем заболевания печени, иммуноопосредованные заболевания печени, метаболические заболевания печени, смешанные заболевания, такие как неалкогольная жировая инфильтрация печени и осложнения печеночной недостаточности (такие как фульминантная печеночная недостаточность или печеночно-клеточная карцинома).

В частности, неалкогольная жировая инфильтрация печени (NAFLD) представляет собой распространенное нарушение печени с гистологическими признаками вызванной алкоголем жировой инфильтрации печени у индивидуумов, которые потребляют небольшое количество или не употребляют алкоголь (Yeh M. et al., 2007; Marchesini et al., 2003). NAFLD обусловлена аномальным удержанием липидов в клетках (обычно определяемым как стеатоз), событием, более частым в печени, поскольку этот орган является в первую очередь ответственным за метаболизм липидов. NAFLD имеет спектр гистологических форм, включая стеатоз печени и неалкогольный стеатогепатит (NASH), который характеризуется воспалением печени, стеатозом, некрозом и фиброзом в результате разрушения клеток печени. Состояния, ассоциированные с NAFLD, изменчивы и включают диабет 2 типа, ожирение, дислипидемию, метаболический синдром, лечение гепатотоксическими лекарственными средствами, воздействие токсинов, инфекционных агентов или других экзогенных причин.

Несмотря на то что NAFLD, как правило, следует доброкачественному, не прогрессирующему клиническому течению, NASH представляет собой потенциально серьезное заболевание; у настолько многих, как у 25% пациентов, оно может прогрессировать до фиброза на поздних стадиях, цирроза, и они могут испытывать осложнения портальной гипертензии, печеночной недостаточности и печеночноклеточной карциномы, что делает раннюю и правильную оценку обязательной (Yeh M. et al., 2007).

Системы визуализации печени можно использовать для оценки также структуры печени и присутствия стеатоза. Однако биопсия печени остается золотым стандартом для оценки фиброза печени, но этот способ анализа нельзя осуществлять для каждого единичного исследования из-за его инвазивности. Неинвазивную оценку биохимии и метаболизма в печени часто используют для определения заболеваний печени, таких как NAFLD и NASH (Gressner A. et al., 2009; Vuppalanchi R., Chalasani N., 2009). При использовании плазмы высокий уровень ферментов, таких как аланинаминотрансфераза (ALAT), аспаратаминотрансфераза (ASAT), щелочная фосфатаза (AP) и/или гамма-глутамилтранспептидаза (GGT), так же как присутствие других белков печеночного происхождения (включая гаптоглобин, общий билирубин, альфа-2-микроглобулин, резистин, расщепленный или интактный цитокератин-18), обычно измеряют в дополнение к глюкозе в сыворотке и параметрам устойчивости к инсулину. Поскольку уровень активности ALAT часто увеличен у пациентов с NASH (Angulo P. et al., 2002), этот критерий считают сурrogатным маркером для оценки поражения печени. Фактически надежные неинвазивные способы недоступны для правильной диагностики NAFLD или NASH и даже гистологические признаки не всегда являются достаточными для того, чтобы правильно отличить NAFLD или NASH от других состояний, таких как алкогольная болезнь печени (Yeh M. et al., 2007; Vuppalanchi R., Chalasani N., 2009).

Способы эффективного лечения фиброзных заболеваний печени и, в частности, NAFLD и NASH все еще являются недостаточными. Не разработан способ лечения пациентов с NASH, и несколько возможных способов лечения тестируют в клинических исследованиях (Vuppalanchi R., Chalasani N., 2009; Dowman J.K. et al., 2009). Эти исследования включают использование многих различных семейств химических соединений (фибраты, тиазолидиндионы, бигуаниды, статины, каннабиноиды) и терапевтических мишеней (ядерные рецепторы, рецепторы ангиотензина, рецепторы каннабиноида, HMG-CoA-редуктаза). Недавно исследования с использованием тиазолидиндионов (розиглитазона и пиоглитазона) показали, что эти лекарственные средства могут улучшать состояние печени, но лечение этими лекарственными средствами не лишено побочных эффектов, таких как высокий риск застойной сердечной недостаточности и остеопороза, так же как набор массы тела с физиологическими эффектами на пациента (Dowman J.K. et al., 2009; Shiri-Sverdlov R. et al., 2006; Neuschwander-Tetri et al., 2003). Клинические исследования, включающие введение каннабиноидов, выявили проблему невропсихиатрического нарушения (Vuppalanchi R., Chalasani N., 2009). В других разрабатываемых в настоящее время способах терапии стремятся к оценке лекарственных средств против NASH в качестве антиоксидантов, но ни один из этих способов лечения еще не дал убедительных результатов (Nelson A. et al., 2009).

В настоящее время не существует одобренных способов лечения NASH, однако два соединения с различными механизмами действия в настоящее время проходят клинические исследования фазы 3: обетихоловая кислота (OCA, агонист FXR) и элафибранор.

1-[4-Метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-он (элафибранор или ELA, ранее называемый GFT505), двойной агонист PPAR-альфа/дельта, описанный в WO 2004/005233, имеет свойства, которые могут обеспечивать преимущества для лечения ряда гастроэнтерологических заболеваний и заболеваний печени, в частности холестатических заболеваний, таких как PBC (первичный билиарный холангит) и PSC (первичный склерозирующий холангит), или заболеваний печени, в частности видов неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), таких как неалко-

гольный стеатогепатит (NASH).

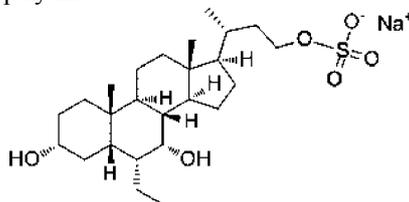
Элафибранор тестировали по клинической эффективности при NASH в 1-летнем исследовании фазы 2b на основе биопсии печени (GFT505-2127), одном из самых крупных интервенционных исследований, когда-либо проводившихся для NASH. Введенный до настоящего времени более 800 пациентам и здоровым добровольцам, элафибранор имеет обеспечивающие преимущества для NASH свойства, включая, в частности, улучшение маркеров дисфункции печени, включая ALAT, ASAT, γ GT, ALP; улучшение чувствительности к инсулину и гомеостаза глюкозы; благоприятные эффекты на липиды в плазме, включая уменьшение уровней в плазме триглицеридов и LDL-C, и увеличение уровней HDL-C; противовоспалительные свойства; эффективность по отношению к гистологическим параметрам NASH (стеатоз, воспаление, фиброз) в моделях заболевания на животных - виды антифиброзной активности; и отсутствие опасений по поводу безопасности подтверждено в полном наборе токсикологических анализов вплоть до 2-летних исследований канцерогенности. Элафибранор в настоящее время оценивают в клиническом исследовании фазы 3 для лечения NASH.

Начата также оценка этой молекулы для лечения PBC в клиническом исследовании фазы 2.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированному продукту для лечения фиброзного или холестатического заболевания, содержащему

- (i) элафибранор (ELA) или его фармацевтически приемлемую соль; и
- (ii) агонист FXR, выбранный из обетихоловой кислоты (OCA) или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения структурной формулы



(INT-767) или его фармацевтически приемлемой соли.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения комбинированный продукт представляет собой композицию ELA или его фармацевтически приемлемой соли, агониста FXR, выбранного из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения INT-767 или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемого носителя.

В другом предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения комбинированный продукт представляет собой набор из частей, содержащий ELA или его фармацевтически приемлемую соль и агонист FXR, выбранный из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения INT-767 или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения ELA или его фармацевтически приемлемая соль и агонист FXR, выбранный из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединение INT-767 или его фармацевтически приемлемая соль присутствуют в синергически эффективном количестве для лечения указанного заболевания.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения фиброзного или холестатического заболевания, включающему введение предложенного выше комбинированного продукта субъекту, имеющему фиброзное или холестатическое заболевание.

При этом заболевание представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, цирроз печени, первичный билиарный холангит (PBC) или первичный склерозирующий холангит (PSC), предпочтительно PBC.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения заболевание представляет собой фиброз или цирроз печени, индуцированный неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), или фиброз или цирроз, индуцированный неалкогольным стеатогепатитом (NASH).

В еще одном предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 80 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 7 до 17 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 40 до 60 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 12,5 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 32 до 48 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 4 до 10 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 27 до 40 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 3 до 8 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 16 до 24 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 2 до 5 мг/сутки; или

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 8 до 12 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 1 до 2,5 мг/сутки.

Настоящее изобретение также относится к применению указанного выше комбинированного продукта для лечения фиброзного или холестатического заболевания. При этом заболевание представляет собой фиброз печени, цирроз печени, первичный билиарный холангит (PBC) или первичный склерозирующий холангит (PSC), предпочтительно PBC.

В еще одном предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения заболевание представляет собой фиброз или цирроз печени, индуцированный неалкогольной жировой болезнью печени, или фиброз или цирроз, индуцированный неалкогольным стеатогепатитом.

В еще одном предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения указанный выше комбинированный продукт применяют в следующей дозировке:

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 80 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 7 до 17 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 40 до 60 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 12,5 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 32 до 48 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 4 до 10 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 27 до 40 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 3 до 8 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 16 до 24 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 2 до 5 мг/сутки; или

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 8 до 12 мг/сутки, и OCA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 1 до 2,5 мг/сутки.

Описание фигур

На фиг. 1 показан эффект элафибранора (GFT505), OCA и их комбинации на фиброз печени у крыс, которых кормили CDAA/хол. (n=10/группу).

Процент пораженной фиброзом поверхности оценивали посредством морфометрической количественной оценки положительной по пикросириусу площади относительно площади среза печени. Данные выражены как среднее±SD. # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 с использованием t-критерия Стьюдента. § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001, §§§§ p<0,0001 с использованием теста Краскела-Уоллиса и апостериорного теста Данна без коррекции. HSA, модель на основе наилучшего отдельного средства.

На фиг. 2 показан эффект элафибранора (GFT505), OCA и их комбинации на содержание коллагена в печени у крыс, которых кормили CDAA/хол. (n=10/группу).

Данные выражены как среднее±SD. # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 с использованием t-критерия Стьюдента. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 с использованием однофакторного ANOVA и апостериорного теста Фишера без коррекции. § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001, §§§§ p<0,0001 с использованием теста Краскела-Уоллиса и апостериорного теста Данна без коррекции. HSA, модель на основе наилучшего отдельного средства.

На фиг. 3 показан эффект элафибранора (GFT505), OCA и их комбинации на экспрессию генов, вовлеченных в ремоделирование тканей и воспаление в печени, у крыс, которых кормили CDAA/хол. (n=10/группу).

Экспрессию α SMA (ACTA2), TIMP1 и TGF β оценивали посредством полуколичественной ПЦР с оценкой в реальном времени. Данные выражены как среднее±SD. # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 с использованием t-критерия Стьюдента. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 с использованием однофакторного ANOVA и апостериорного теста Фишера без коррекции. § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001, §§§§ p<0,0001 с использованием теста Краскела-Уоллиса и апостериорного теста Данна без коррекции. HSA, модель на основе наилучшего отдельного средства.

На фиг. 4 показан дифференциальный антифиброзный эффект элафибранора и INT-767 на индуцированные TGF β hHSC.

Поддерживаемые в отсутствие сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с элафибранором (A) и INT-767 (B) перед активацией с использованием профиброгенного цитокина TGF β 1 (1 нг/мл). Через 48 ч инкубации экспрессию α -SMA измеряли посредством ELISA. Полученные значения трансформировали в процент ингибирования по сравнению с контролем с TGF β 1. Данные представлены как среднее (из четырех повторов)±стандартное отклонение (SD).

На фиг. 5 показана комбинация элафибранора с INT-767 синергически ингибирует продукцию α -SMA в индуцированных TGF β 1 hHSC

Комбинации тестировали в формате матрицы зависимости ответа от дозы и анализировали в соответствии с моделью аддитивности с приращением по Блисссу (EOB). Получали серии разведений элафибранора (строка) и INT-767 (столбец), включая соответствующий им контроль с DMSO. Полученные смеси добавляли к поддерживаемым в отсутствие сыворотки HSC за 1 ч до активации с использованием профиброгенного цитокина TGF β 1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования α -SMA по сравнению с контролем с TGF β 1 для всех комбинаций пар. Данные представлены как среднее из четырех повторов. (B) Показатели EOB рассчитывали, как описано в "Материалах и способах". Любую пару соединений с

значениями $EOB > 10$ считали синергической (окрашено от светло-серого до черного). Рассчитывали также суммарный показатель EOB , включающий все комбинации. (С) Значения данных, выведенные для синергических комбинаций пар, наносили на график в представлении столбчатой диаграммы. Данные представлены как среднее (из четырех повторов) \pm стандартное отклонение (SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ с использованием t-критерия Стьюдента для сравнения группы комбинации с наилучшим отдельным средством.

Подробное описание изобретения

Как используют выше, термин "введение" включает любой способ введения, такой как пероральное, подкожное, подъязычное введение, введение через слизистые оболочки, парентеральное, внутривенное, внутриартериальное, трансбуккальное, подъязычное, местное, вагинальное, ректальное, глазное, ушное, назальное, ингаляционное, внутримышечное, внутрикостное, интратекальное и чрескожное введение или их комбинацию. В предпочтительных вариантах осуществления соединения вводят перорально, в частности, в форме одной или нескольких таблеток.

"Введение" может также включать выдачу рецепта или отпуск по рецепту лекарственной формы, содержащей конкретное соединение. "Введение" может также включать предоставление инструкций для осуществления способа, включающего конкретное соединение или лекарственную форму, содержащую соединение.

В рамках изобретения термин "заболевание" относится к заболеванию, нарушению, состоянию, симптому или показанию. Этот термин используют взаимозаменяемо с фразой "заболевание или нарушение".

Как используют выше и на протяжении этого описания, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желательного результата, применительно к лечению соответствующего нарушения, состояния или побочного эффекта. Понятно, что эффективное количество компонентов по настоящему изобретению может меняться от пациента к пациенту не только из-за выбранных конкретного соединения, компонента или композиции, способа введения и способности компонентов вызывать желательный ответ у индивидуума, но также из-за таких факторов, как состояние заболевания или тяжесть состояния, подлежащего облегчению, уровни гормонов, возраст, пол, масса индивидуума, общее состояние здоровья пациента, и тяжесть состояния, подвергаемого лечению, сопутствующие лекарственные средства или специальные диеты, которым следует конкретный пациент, и другие факторы, известные специалисту в данной области, при этом решение о подходящей дозе в конечном счете принимает лечащий врач. Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения улучшенного терапевтического ответа. Эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты компонентов превышают любые токсичные или неблагоприятные эффекты.

Термин "синергический" в рамках изобретения означает, что эффект, достигаемый с использованием комбинированного продукта и способов по этому изобретению, превышает сумму эффектов в результате воздействия компонентов комбинации или способов, включающих один из компонентов, по отдельности и в количествах, используемых в этих способах и их композициях. Такой синергизм можно определять в соответствии со способами, хорошо известными в данной области, например, с использованием способа приращения по Блессу (EOB).

Комбинированный продукт по изобретению может обеспечивать лучшие эффекты, чем эффект, достижимый с помощью каждого из его компонентов, использованного отдельно, в частности, при использовании в синергически эффективном количестве. "Синергически эффективное количество" представляет собой количество каждого из компонентов комбинированного продукта, позволяющее достижение синергического эффекта при введении нуждающемуся в этом субъекту. Иными словами, когда компоненты (i) и (ii) используют в синергически эффективном количестве, объединенный эффект количеств (i) и (ii) превышает сумму терапевтических эффектов количеств (i) и (ii), введенных индивидуально. Как упомянуто выше, количество каждого из соединений (i) и (ii), вводимое пациенту, можно уменьшать по сравнению с количеством указанных соединений (i) и (ii), введенных индивидуально. Например, количество каждого компонента можно уменьшать по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза или даже по меньшей мере в 3 раза или более, например по меньшей мере в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. Например, количество EIA , вводимого пациентам в клинических исследованиях, составляет 80 или 120 мг/сутки, и количество OCA , вводимого пациентам в клинических исследованиях, составляет 10 или 25 мг/сутки, и синергическое количество по изобретению с уменьшением в 3 раза может составлять 27 или 40 мг/сутки EIA и 3 и 8 мг/сутки OCA .

В соответствии с настоящим изобретением термин "агонисты PPAR (нескольких PPAR)" относится к агонистам активируемого пролифератором пероксисом рецептора, которые представляют собой класс лекарственных средств, играющих центральную роль в гомеостазе липидов и глюкозы. PPAR α в основном влияет на метаболизм жирных кислот, и его активация уменьшает уровни липидов, в то время как PPAR γ в основном вовлечен в регуляцию адипогенеза, энергетический баланс и биосинтез липидов. PPAR δ участвует в окислении жирных кислот в основном в скелетных и сердечной мышцах, но он регу-

лирует также уровни в крови глюкозы и холестерина.

По изобретению термин "агонист PPAR-альфа" в рамках изобретения включает, но без ограничения, фенофибрат, ципрофибрат, пемафибрат, гемфиброзил, клофибрат, бинифибрат, клинофибрат, клофибринову кислоту, никофибрат, пирифибрат, плафибрид, ронифибрат, теофибрат, токофибрат и SR10171.

По изобретению термин "агонист PPAR-гамма" в рамках изобретения включает, но без ограничения, розиглитазон, пиоглитазон, дейтерированный пиоглитазон, эфатуазон, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001 и ALL-4.

По изобретению термин "агонист PPAR-дельта" в рамках изобретения включает, но без ограничения, GW501516 (эндурабол или ({4-[(4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3-тиазол-5-ил}метил)сульфанил]-2-метилфенокси}уксусную кислоту)) или MBX8025 (селаделпар или {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2H-[1,2,3]триазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту), или GW0742 ({4-[[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метил]тио]-2-метилфенокси}уксусную кислоту), или L165041, или HPP-593, или NCP-1046.

По изобретению термин "агонист PPAR-альфа/гамма" (также называемый глитазарами) в рамках изобретения включает, но без ограничения, сароглитазар, алеглитазар, мураглитазар, тезаглитазар, DSP-8658.

По изобретению термин "агонист PPAR-альфа/дельта" в рамках изобретения включает, но без ограничения, ELA или T913659.

По изобретению термин "агонист PPAR-гамма/дельта" в рамках изобретения включает, но без ограничения, конъюгированную линолеиновую кислоту (CLA), T3D-959.

По изобретению термин "агонист PPAR-альфа/гамма/дельта" в рамках изобретения включает, но без ограничения, IVA337 (ланифибранор) или TTA (тетрадецилтиоуксусную кислоту), или бавачинин, или GW4148, или GW9135, или безафибрат, или лобеглитазон, или CS038. В следующем варианте осуществления агонист PPAR-альфа/гамма/дельта представляет собой 2-(4-(5,6-метилендиоксибензо[d]тиазол-2-ил)-2-метилфенокси)-2-метилпропионовую кислоту (MHY2 013).

Агонист PPAR может находиться в форме соли, гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла. Агонист PPAR может также находиться в форме гидрата, сольвата, полиморфа или сокристалла соли.

Комбинированный продукт по изобретению можно использовать для лечения фиброзного или холестатического заболевания.

Термины "фиброз", "фиброзное заболевание", "фиброзное нарушение" и их склонения обозначают патологическое состояние избыточного накопления фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Более конкретно, фиброз представляет собой патологический процесс, включающий постоянное образование фиброзного рубца и избыточную продукцию внеклеточного матрикса соединительной ткани, в ответ на повреждение ткани. Физиологически накопление соединительной ткани может сглаживать архитектуру и функцию подлежащих органа или ткани.

В соответствии с настоящим изобретением фиброз может представлять собой фиброз любого органа или ткани. Иллюстративные, неограничивающие примеры фиброза конкретного органа включают фиброз печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, яичка, яичника, надпочечника, артерии, вены, ободочной кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных протоков, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, сустава или желудка.

В предпочтительном варианте осуществления фиброзное нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечника, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), костного мозга, кишечника и сустава (например, коленного, плечевого или других суставов).

В более предпочтительном варианте фиброзное нарушение выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, легкого, кожи, почки и кишечника.

В более предпочтительном варианте подвергнутое лечению фиброзное нарушение выбрано из группы, состоящей из следующего не исчерпывающего списка фиброзных нарушений: неалкогольный стеатогепатит (NASH), пульмонарный фиброз, идиопатический пульмонарный фиброз, фиброз кожи, фиброз глаза, эндомикардиальный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессивный фиброз (осложнение пневмоконоиоза работников угольной промышленности), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, фиброз легких, следующий за хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей (COPD, астмой, эмфиземой, легким курьельщика, туберкулезом, IPF), индуцированный алкоголем или наркотическими веществами фиброз печени, цирроз печени, индуцированный инфекцией фиброз печени, индуцированный радиоактивным облучением или химиотерапевтическим средством фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермия/системная склеродермия, артрофиброз, некоторые формы адгезивного капсулита, хронические фиброзирующие холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC) и первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), периимплантный фиброз и асцитоз.

Холестаз определяют, как уменьшение выделения желчи из-за нарушенной секреции гепатоцитами (печеночноклеточный холестаз) или обструкции выделения желчи через внутри- или внепеченочные

желчные протоки (обструктивный холестаз). В клинической практике холестаз представляет собой любое состояние, при котором выделение желчи из печени замедлено или заблокировано.

Примеры воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний, метаболических заболеваний и холестатических заболеваний включают метаболические заболевания печени, неалкогольную жировую инфильтрацию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), индуцированные наркотическими веществами заболевания печени, индуцированные алкоголем заболевания печени, индуцированные инфекционными агентами заболевания печени, воспалительные заболевания печени, опосредованные дисфункцией иммунной системы заболевания печени, дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания, рестеноз, синдром X, метаболический синдром, диабет, ожирение, гипертензию, хронические холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродермию/системную склеродермию, воспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания, злокачественные опухоли, рак печени, печеночноклеточную карциному, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, рака желудка, менингиомы, ассоциированную с нейрофиброматозом, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, экзокринные опухоли поджелудочной железы, лейкоз, миелолифферативные/миелодиспластические заболевания, мастоцитоз, дерматофибросаркома, солидные опухоли, включающие злокачественные опухоли молочной железы, легкого, щитовидной железы или колоректальный рак, рак предстательной железы, фиброз или цирроз печени любого происхождения, индуцированный метаболическим заболеванием фиброз или цирроз печени, индуцированный NAFLD фиброз или цирроз, индуцированный NASH фиброз или цирроз, индуцированный алкоголем фиброз или цирроз печени, индуцированный наркотическими веществами фиброз или цирроз печени, индуцированный инфекционными агентами фиброз или цирроз печени, индуцированный паразитарной инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный бактериальной инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный вирусной инфекцией фиброз или цирроз, индуцированный инфекцией HBV фиброз или цирроз печени, индуцированный инфекцией HCV фиброз или цирроз печени, индуцированный инфекцией HIV фиброз или цирроз печени, индуцированный двойной инфекцией HCV и HIV фиброз или цирроз печени, индуцированный радиоактивным облучением или химиотерапией фиброз или цирроз, фиброз желчных протоков, фиброз или цирроз печени, обусловленный любым хроническим холестатическим заболеванием, фиброз кишечника любой этиологии, индуцированный болезнью Крона фиброз, индуцированный язвенным колитом фиброз, фиброз кишечника (например, тонкого кишечника), фиброз ободочной кишки, фиброз желудка, фиброз кожи, фиброз эпидермиса, фиброз эндодермы, фиброз кожи, обусловленный склеродермией/системной склеродермией, фиброз легких, фиброз легких, следующий за хроническими воспалительными заболеваниями дыхательных путей, такими как COPD, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез, пульмонарный фиброз, идиопатический пульмонарный фиброз (IPF), фиброз сердца, фиброз почки, нефрогенный системный фиброз, фиброз мышцы, фиброз мягких тканей (например, средостения или забрюшинного пространства), фиброз костного мозга, фиброз сустава, фиброз сухожилия, фиброз хряща, фиброз поджелудочной железы, фиброз матки, фиброз нервной системы, фиброз яичка, фиброз яичника, фиброз надпочечника, фиброз артерии, фиброз вены, фиброз глаза, эндомикардиальный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессивный фиброз (осложнение пневмокониоза работников угольной промышленности), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, периимплантационный фиброз и асбестоз, артрофиброз, адгезивный капсулит.

Термин "лечение" или "лечить" относится к терапии, предотвращению или профилактике нарушения у нуждающегося в этом субъекта. Лечение включает введение комбинированного продукта по изобретению субъектам (например, пациентам), имеющим указанное нарушение, для предотвращения, излечения, задержки, обращения или замедления прогрессирования нарушения, таким образом, улучшения состояния пациентов. Лечение можно также подвергать субъектов, которые либо являются здоровыми, либо подвержены риску развития нарушения, такого как иммунное (например, аутоиммунное), воспалительное, фиброзное или холестатическое нарушение.

Термин "субъект" относится к млекопитающему и более конкретно, к человеку. Субъектов, подлежащих лечению по изобретению, можно подходящим образом выбирать на основании нескольких критериев, ассоциированных с иммунными (например, аутоиммунными), воспалительными, фиброзными и холестатическими патологическими процессами, таких как предшествующее и/или текущее медикаментозное лечение, ассоциированные патологии, генотип, воздействие факторов риска, так же как любого другого соответствующего биомаркера, который можно оценивать посредством любого подходящего иммунологического, биохимического или ферментного способа.

Авторы изобретения в настоящем описании показывают, что комбинация агониста PPAR и агониста FXR, в частности комбинация ELA и OCA или INT-767, в частности комбинация ELA и OCA, может обеспечивать преимущество для более широкой популяции пациентов и может иметь синергический эффект, таким образом, позволяя уменьшение терапевтической дозы. Ассоциированное уменьшение терапевтической дозы может уменьшать частоту возникновения неблагоприятных эффектов лекарственного

средства. Соответственно изобретение также относится к способу лечения заболевания, как определено выше, с уменьшенной частотой возникновения неблагоприятных эффектов лекарственного средства.

Частоту и/или количество применительно к введению может адаптировать специалист в данной области в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Как правило, комбинированный продукт по настоящему изобретению можно вводить для лечения заболевания в следующих дозировках:

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 80 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 7 до 17 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 40 до 60 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 12,5 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 32 до 48 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 4 до 10 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 27 до 40 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 3 до 8 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 16 до 24 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 2 до 5 мг/сутки; или

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 8 до 12 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 1 до 2,5 мг/сутки.

Время лечения можно менять в большой степени в зависимости от состояния, подлежащего лечению, и стадии указанного состояния. Например, комбинированный продукт можно вводить по меньшей мере двое или более последовательных суток, например по меньшей мере 7, 8, 9 или 10 суток или более; по меньшей мере один неделю или более, например по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 60, 70 или 72 недели или более; по меньшей мере один месяц или более, например по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 24 месяцев или более; или по меньшей мере один год или более, например по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет или более.

Изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Примеры

Материалы и способы.

Оценка элафибранора, ОСА и комбинации элафибранора+ОСА в хронической модели с CDAA+1% холестерин (12 недель).

Профилактические эффекты элафибранора (GFT505) отдельно, ОСА отдельно и комбинации обоих оценивали в модели фиброзирующего NASH на крысах, которых кормили в соответствии с диетой CDAA+1% холестерин. 150-175 г самцов крыс Wistar кормили в соответствии с контрольной (CSAA) диетой в соответствии с диетой CDAA+1% холестерин или в соответствии с диетой CDAA+1% холестерин, дополненной элафибранором 1, 3 и 10 мг/кг/сутки, ОСА 10 и 30 мг/кг/сутки или комбинированными лекарственными средствами (элафибранором 1, 3 и 10 мг/кг/сутки в комбинации с ОСА 10 мг/кг/сутки) в течение 12 недель.

Массу тела и потребление корма мониторировали дважды в неделю. На последние сутки обработки крыс умерщвляли после 6-часового периода голодания. Печень быстро вырезали для биохимических и гистологических исследований.

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии со стандартными протоколами и в соответствии со стандартными рекомендациями по надлежащему содержанию и использованию лабораторных животных.

Гистология.

Погружение ткани и получение срезов.

Фрагменты печени сначала фиксировали в течение 12 ч в растворе 4% формалина. Затем фрагменты печени промывали 30 мин в PBS и дегидратировали в растворах этанола (в последовательных банях с 70, 80, 95 и 100% этанолом). Фрагменты печени инкубировали в трех различных банях с ксилолом (Sigma-Aldrich, кат. #534056), затем в двух банях с вазелиновым маслом (56°C). Затем фрагменты печени помещали в лотки, которые осторожно заполняли Histowax® для полного покрытия тканей.

Парафиновые блоки, содержащие фрагменты ткани, извлекали из лотки и хранили при комнатной температуре. Блоки печени нарезали на срезы по 3 мкм.

Окрашивание гематоксилином/эозином.

Срезы печени депарафинировали, регидратировали и инкубировали в течение 3 мин в гематоксилине Mayer's (Microm, кат. #F/C0303). Затем срезы печени ополаскивали водой и инкубировали 1 мин в эозине G (VWR, кат. #1.09844.1000). Срезы ополаскивали водой, затем дегидратировали и фиксировали с использованием среды CV Mount (Leica, кат. #14046430011).

Окрашивание пикросирусом красным.

Срезы печени депарафинировали, регидратировали и инкубировали в течение 15 мин в растворе Fast Green FCF 0,1% (Sigma-Aldrich, кат. # F7258) перед ополаскиванием в бане с 0,5% уксусной кислотой (Panreac, кат. #131008,1611). Затем срезы печени ополаскивали водой и инкубировали 30 мин в растворе 0,1% сируса красного (Direct Red 80, Fluka, кат. #43665) в насыщенной водной пикриновой кисло-

те (Sigma-Aldrich, кат. #P6744). Затем срезы дегидратировали и фиксировали с использованием среды CV Mount (Leica, кат. #14046430011).

Гистологические исследования.

Технический специалист, не осведомленный об источнике каждого образца печени, проводил гистологические исследования. Виртуальные срезы получали с использованием сканера Pannoramic 250 от 3D Histech. Каждому животному приписывали балл, суммирующий основные гистологические очаги NASH, в соответствии с NASH Clinical Research Network (Kleiner 2005, Brunt 1999). Кратко оценивали в баллах стеатоз, лобулярное воспаление и баллонирование гепатоцитов. Показатель активности NAFLD (показатель NAS) определяли для каждого индивидуума как невзвешенную сумму показателей стеатоза, лобулярного воспаления и баллонизирующего повреждения.

С использованием программного обеспечения Quant Center (3D Histech, включающего модули Pattern Quant и Histo Quant), количественно оценивали области с окрашенным коллагеном. Кратко Pattern Quant использовали для детекции ткани и измерения ее поверхности. Затем Histo Quant использовали для детекции содержания окрашенного коллагена и измерения его поверхности, на основе способа цветового порога. Затем площадь фиброза выражали как процент поверхности коллагена от всей ткани для животного.

Измерение содержания печеночного коллагена.

Содержание печеночного коллагена определяли с использованием соответствующего набора QuickZyme (анализ общего коллагена, кат. #QZB-totcol2). Анализ основан на детекции гидроксипролина, представляющего собой непротеиногенную аминокислоту, в основном, обнаруживаемую в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в гидролизатах ткани можно использовать в качестве непосредственного показателя количества коллагена, присутствующего в ткани (без различий между проколлагеном, зрелым коллагеном и продуктами деградации коллагена).

Полный гидролиз образцов ткани в 6 М HCl при 95°C необходим перед дозированием гидроксипролина. Анализ приводит к образованию хромогена с максимальной оптической плотностью при 570 нм. Результаты выражают как мг коллагена/г печени.

Анализ экспрессии генов печени.

Тотальную РНК выделяли из печени крыс с использованием набора RNeasy Mini (Qiagen), следуя инструкциям производителя. Тотальную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV RT (обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони) (Invitrogen, кат. #28025) в 1× буфере для RT (Invitrogen), 0,5 мМ DTT (Invitrogen), 0,18 мМ dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Amersham) и 30 ед. ингибитора РНКазы (Promega).

Затем проводили количественную ПЦР с использованием системы для ПЦР с детекцией в реальном времени CFX96 Touch™ (Biorad). Кратко реакции ПЦР проводили в формате 96-WP в общем объеме 25 мкл, содержащем 1 мкл продукта реакции обратной транскрипции, 0,5 мкл обратного и прямого праймеров (10 пмоль каждого), и 12,5 мкл 2X смеси iQ SYBR Green Supermix (BioRad), с использованием следующих последовательностей праймеров.

Ген	Прямой	Обратный
RPLP0	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCT CC (SEQ ID NO:1)	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCAC AG (SEQ ID NO:2)
αSMA (ACTA2)	ACTGGGACGACATGGAAAAG (SEQ ID NO:3)	CATCTCCAGAGTCCAGCACA (SEQ ID NO:4)
TIMP1	TCCCCAGAAATCATCGAGAC (SEQ ID NO:5)	TCAGATTATGCCAGGGAACC (SEQ ID NO:6)
TGFB1	TGAGTGGCTGTCTTTGACG (SEQ ID NO:7)	TGGGACTGATCCCATTGATT (SEQ ID NO:8)
CCR5	CAGAACAGTCAACTTTGGGG (SEQ ID NO:9)	ACGTGGAAAATGAGGACTGC (SEQ ID NO:10)

Уровни экспрессии нормализовали с использованием экспрессии гена Rplp0 в качестве эталона в образцах.

Для каждого гена получали стандартные кривые посредством выбора наилучших точек (по меньшей мере трех точек), чтобы получить эффективность реакции ПЦР, близкую к 100%, и коэффициент корреляции, близкий к 1. Уровни экспрессии определяли с использованием уравнения стандартной кривой как для гена домашнего хозяйства, так и для гена-мишени (принимая во внимание конкретную эффективность ПЦР для каждого гена-мишени).

Оценка комбинации элафибранора и другого агониста FXR в модели *in vitro* фиброгенеза в печени.

Культивирование hHSC.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (InnoproT) культивировали в среде STeCM (ScienCell, кат. #5301), дополненной 2% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, ScienCell, кат. #0010),

1% пенициллином/стрептомицином (ScienCell, кат. #0503) и добавкой для выращивания звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell, кат. #5352). Флаконы для культивирования клеток покрывали поли-L-лизинем (Sigma, кат.# P4707) для лучшей адгезии.

Получение композиций: матрица комбинаций 2 компонентов (агониста FXR/элафибранора).

Агонист FXR INT-767 (CAS#1000403-03-1, кат. #HY-12434, партия #19249) получали на коммерческой основе из Naoyuan Chemexpress. Для этих экспериментов получали матрицу в шахматном порядке. INT-767 и элафибранор растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Fluka, кат. #41640) и получали серийные разведения в сериях из 5 точек в ряду (элафибранор) и в сериях из 11 точек в столбце (INT-767) 384-луночного планшета. Затем матрицу комбинации 5X11 получали посредством смешивания 1:1 всех концентраций отдельных средств. Тестируемые концентрации для каждого соединения выбирали на основании литературы (Rizzo et al.; McMahan et al.).

Активация hHSC с использованием TGF- β 1 и обработка соединением.

hHSC рассеивали при плотности $6,5 \times 10^3$ клеток/лунку в 384-луночные планшеты. На следующие сутки культуральную среду удаляли и клетки промывали с использованием PBS (Invitrogen, кат. #14190). hHSC подвергали голоданию в течение 24 ч в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработок с использованием INT-767 и элафибранора, а также их попарных комбинаций поддерживаемые в отсутствие сыворотки hHSC предварительно инкубировали в течение 1 ч с соединениями с последующим добавлением профиброгенного стимулятора TGF- β 1 (PeproTech, кат. #100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде на дополнительный 48-часовой период.

ELISA α -SMA.

Уровень α -SMA измеряли с использованием сэндвич-ELISA. Кратко лунки планшета для ELISA сначала покрывали антителом для связывания (мышинным моноклональным антителом против ACTA2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в PBS+0,2% Tween 20, блокирующей раствор, состоящий из PBS +0,2% BSA, добавляли на 1 ч с последующим другим циклом промывки. Лизаты клеток переносили в лунки для связывания с антителом для связывания на период 2 ч при комнатной температуре. После процедуры промывки антитело для детекции (биотинилированное мышинное моноклональное антитело против ACTA2, Abnova) добавляли на 2 ч при комнатной температуре с последующими 3 промывками. Для детекции сначала добавляли конъюгированный с HRP стрептавидин (R&D Systems, кат. # DY998) на 30 мин при комнатной температуре. После промывки субстрат HRP TMB (BD#555214) добавляли и инкубировали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. При окислении TMB образует водорастворимый синий продукт реакции, который становится желтым при добавлении серной кислоты (останавливающего раствора), позволяя точное измерение интенсивности при 450 нм с использованием спектрофотометра. Проявившееся окрашивание является прямо пропорциональным количеству α -SMA, присутствующему в лизате.

Определение синергизма способом приращения по Блиссу (ЕОВ).

Значения, полученные в анализах ELISA α SMA, сначала трансформировали в процент ингибирования по сравнению с контролем с TGF- β 1. Затем с использованием этих процентов ингибирования определяли ЕОВ (приращение по Блиссу) для определения синергических эффектов комбинаций лекарственных средств. Ожидаемый показатель аддитивности по Блиссу (Е) сначала определяли посредством уравнения

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

где А и В представляют собой процент ингибирования для элафибранора (А) и INT-767 (В) в данной дозе.

Различие между ожидаемым по Блиссу и наблюдаемым ингибированием для комбинированных INT-767/элафибранора в такой же дозе представляет собой показатель "приращения по Блиссу".

Показатель приращения по Блиссу=0 показывает, что комбинированное лечение является аддитивным (как ожидали для эффектов на независимые пути);

показатель приращения по Блиссу>0 показывает активность, превышающую аддитивную (синергизм);

показатель приращения по Блиссу<0 показывает, что комбинация менее активна, чем аддитивная (антагонизм).

Для комбинаций INT-767/элафибранора, дополнительный общий показатель Блисса рассчитывали посредством суммирования всех ЕОВ.

Для подтверждения синергизма, экспериментальные значения, соответствующие наивысшему показателю ЕОВ для комбинаций агонистов FXR/элафибранора, наносили на столбчатую диаграмму.

Значимость наблюдаемых различий между INT-767/элафибранором и наивысшим значением для отдельного средства определяли посредством t-критерия Стьюдента. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение.

Оценка элафибранора, ОСА и комбинации элафибранора+ОСА в хронической модели с СРАА+1% холестерин (12 недель).

Результаты представлены в следующей таблице и на фиг. 1-3.

	GFT505	OCA	GFT505+OCA
	3мг/кг/сутки	10мг/кг/сутки	
Поверхность фиброза	34%±17% ***	74%±45%	19%±4% #
Содержание печеночного коллагена	45%±12% ***	67%±23% **	34%±5% #
Уровень мРНК α -SMA	66%±27%	109%±68%	39%±18% #
Уровень мРНК TIMP1	78%±23%	110%±43%	46%±13% ##
Уровень мРНК TGF β 1	94%±20%	110%±23%	67%±16% ##
Уровень мРНК CCR5	103%±51%	81%±28%	56%±17% #

Процент по отношению к крысам с CDAA+1% холестерин без обработки.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с группой CDAA+1% холестерин (ANOVA+Бонферрони).

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по сравнению с наилучшим отдельным средством (t-критерий Стьюдента).

(+ маркер воспаления).

Западный стиль жизни неизменно связан с высокой частотой возникновения неалкогольного стеатогепатита (NASH), хронического заболевания печени, которое часто прогрессирует до фиброза и цирроза печени и может в конечном счете привести к печеночно-клеточной карциноме. В настоящее время не существует одобренной терапии для NASH. Комбинации лекарственных средств, нацеленные одновременно на множество терапевтических мишеней, имеют потенциал для очень сильного улучшения ответа на лекарственное средство и для обеспечения преимуществ для самой широкой популяции пациентов. Комбинации лекарственных средств ранее тестировали при других системных заболеваниях, таких как гипертензия, дислипидемия или диабет типа 2, и для них показан лучший контроль лежащих в основе заболеваний и уменьшение заболеваемости и смертности. В недавних исследованиях фазы 2B, как для элафибранора (агониста PPAR α/δ), так и для OCA (агониста FXR) показана эффективность для конечных точек NASH и фиброза. Авторы настоящего изобретения имели намерение сравнить их действие на исходы соответствующей патологии NASH и провести поиск терапевтических преимуществ комбинации.

Для достижения этой цели фиброзирующий NASH индуцировали посредством кормления крыс Wistar в соответствии с диетой с недостаточностью холина и определенным составом L-аминокислот, дополненной холестерином (диетой CDAA/хол.). Животным в группах воздействия вводили либо элафибранор, либо OCA, либо оба соединения на протяжении всего периода исследования. Развитие NASH и фиброза оценивали посредством гистологии. Дополнительные биохимические и молекулярные анализы также проводили для различных соответствующих биомаркеров.

У крыс Wistar, которых кормили в соответствии с диетой CDAA/хол., развивались связанные с NASH гистологические признаки и фиброз с высоким проникновением тяжелого заболевания. Стеатоз на поздних стадиях, лобулярное воспаление и баллонирование присутствовали у всех животных, и показатель NAS [мин. 0-макс. 8] менялся между 6 и 8. Гистология (положительная по пикросириусу площадь) и биохимия (концентрация печеночного коллагена) печени показали в среднем четырехкратное увеличение содержания фиброза печени, и показатель фиброза составлял либо 3, либо 4, для всех животных на диете CDAA/хол., не получавших медикаментозного лечения (фиг. 1, 2). Экспрессия генов, связанных с воспалением, ремоделированием тканей и фиброзом, была увеличенной и соответствовала профилям генов, опубликованных ранее для пациентов с NASH с тяжелым заболеванием (фиг. 3).

Введение элафибранора отдельно ослабляло развитие фиброза, в то время как введение OCA отдельно не ослабляло фиброз значительным образом (фиг. 1, 2). Виды комбинированной обработки являлись более активными для уменьшения фиброза, позволяя уменьшение доз, со сходной эффективностью против фиброза, достигнутой с использованием GFT505 1 и 3 мг/кг в комбинации с OCA 10 мг/кг (фиг. 1, 2). Введение любого лекарственного средства-кандидата отдельно только частично ослабляло увеличение ремоделирования тканей, в то время как комбинация обоих соединений являлась более эффективной по сравнению с любым отдельным средством (фиг. 3).

Таким образом, в настоящем описании показано, что синергическое действие элафибранора и OCA на фиброз печени в модели индуцированного диетой CDAA/хол. NASH обеспечивало сравнимое терапевтическое преимущество при значительно более низких дозах обоих лекарственных средств-кандидатов, по сравнению с любым отдельным средством. От этого исследования реалистично было ожидать, что дозы обоих лекарственных средств-кандидатов можно будет уменьшить по меньшей мере в 1,5, 2, 2,5 или даже по меньшей мере в 3 раза для получения результатов, сходных с результатами для начальной дозы каждого соединения, используемого индивидуально. Кроме того, для элафибранора показан явный защитный эффект на повреждение печени. Эффекты OCA на баллонирование и лобулярное воспаление были достаточно умеренными в этой модели. Из этого исследования, можно заключить, что комбинация элафибранора/OCA может обеспечивать преимущества для более широкой популяции паци-

ентов, и ассоциированное уменьшение терапевтической дозы может уменьшать частоту возникновения неблагоприятных эффектов лекарственного средства.

Оценка комбинации элафибранора и другого агониста FXR в модели *in vitro* фиброгенеза в печени.

Результаты приведены на фиг. 4, 5.

Аномальная персистенция дифференцированных миофибробластов является характеристикой множества фиброзных заболеваний.

После повреждения печени покоящиеся HSC подвергаются процессу активации, характеризующемуся дифференцировкой в положительные по (α -SMA) миофибробласты.

Агонист PPAR элафибранор проявляет антифиброзную активность в hHSC, активированных с использованием профиброгенного цитокина TGF β 1. Уровень маркера α -SMA уменьшали вплоть до 68% с использованием наивысшей тестированной дозы элафибранора (5 мкМ) (фиг. 4A). INT-767 отдельно только немного ингибировал продукцию α -SMA на 13% в наивысшей тестированной дозе (30 мкМ) (фиг. 4B). Для оценки того, может ли комбинация элафибранора с INT-767 уменьшать фиброз синергическим образом, эксперименты с матрицей комбинаций проводили на индуцированных TGF β HSC. Кратко получали разведения растворов INT-767 и элафибранора в шахматном формате, получая матрицу из 55 комбинаций, перекрывающую большую панель соотношений INT-767/элафибранора. Сначала синергизм определяли посредством расчета показателей приращения по Блисссу. Эти эксперименты выявили, что элафибранор может проявлять синергизм с INT-767 для уменьшения продукции α -SMA в активированных HSC (фиг. 5). Один из лучших примеров синергизма показан на фиг. 5C с 2,5 мкМ элафибранора и 1,9 мкМ INT-767. Несмотря на то что для 1,9 мкМ INT-767 отдельно не показано какой-либо антифиброзной активности, при его добавлении к 2,5 мкМ элафибранору синергически увеличивали активность элафибранора и достигали вплоть до 69% ингибирования (по сравнению с 26% для 2,5 мкМ элафибранора отдельно).

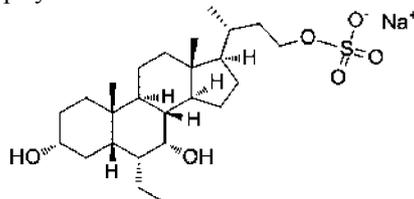
В заключение для синергического действия элафибранора и различных классов агонистов FXR на фиброгенез показано потенциальное преимущество таких комбинаций при множестве типов фиброзных заболеваний.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированный продукт для лечения фиброзного или холестатического заболевания, содержащий

(i) элафибранор (ELA) или его фармацевтически приемлемую соль; и

(ii) агонист FXR, выбранный из обетихоловой кислоты (OCA) или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения структурной формулы



(INT-767) или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Комбинированный продукт по п.1, где комбинированный продукт представляет собой композицию ELA или его фармацевтически приемлемой соли, агониста FXR, выбранного из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения INT-767 или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемого носителя.

3. Комбинированный продукт по п.1 или 2, где комбинированный продукт представляет собой набор из частей, содержащий ELA или его фармацевтически приемлемую соль и агонист FXR, выбранный из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения INT-767 или его фармацевтически приемлемой соли.

4. Комбинированный продукт по любому из пп.1-3, где ELA или его фармацевтически приемлемая соль и агонист FXR, выбранный из OCA или ее фармацевтически приемлемой соли и соединения INT-767 или его фармацевтически приемлемой соли, присутствуют в синергически эффективном количестве для лечения указанного заболевания.

5. Способ лечения фиброзного или холестатического заболевания, включающий введение комбинированного продукта по любому из пп.1-4 субъекту, имеющему фиброзное или холестатическое заболевание.

6. Способ по п.5, где заболевание представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, цирроз печени, первичный билиарный холангит (PBC) или первичный склерозирующий холангит (PSC).

7. Способ по п.6, где заболевание представляет собой PBC.

8. Способ по п.6, где заболевание представляет собой фиброз или цирроз печени, индуцированный неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), или фиброз или цирроз, индуцированный неалко-

гольным стеатогепатитом (NASH).

9. Способ по любому из пп.5-8, где

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 80 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 7 до 17 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 40 до 60 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 12,5 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 32 до 48 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 4 до 10 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 27 до 40 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 3 до 8 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 16 до 24 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 2 до 5 мг/сутки; или

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 8 до 12 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 1 до 2,5 мг/сутки.

10. Применение комбинированного продукта по любому из пп.1-4 для лечения фиброзного или холестатического заболевания.

11. Применение по п.10, где заболевание представляет собой фиброз печени, цирроз печени, первичный билиарный холангит (PBC) или первичный склерозирующий холангит (PSC).

12. Применение по п.11, где заболевание представляет собой PBC.

13. Применение по п.10, где заболевание представляет собой фиброз или цирроз печени, индуцированный неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), или фиброз или цирроз, индуцированный неалкогольным стеатогепатитом (NASH).

14. Применение по любому из пп.10-13, где

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 80 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 7 до 17 мг/сутки;

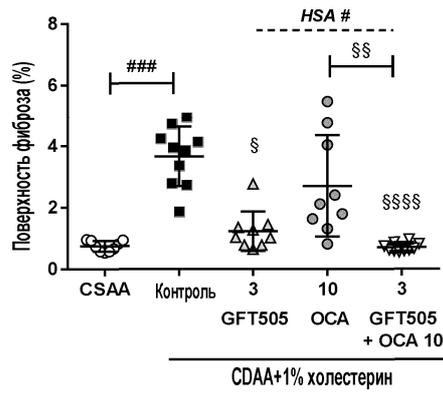
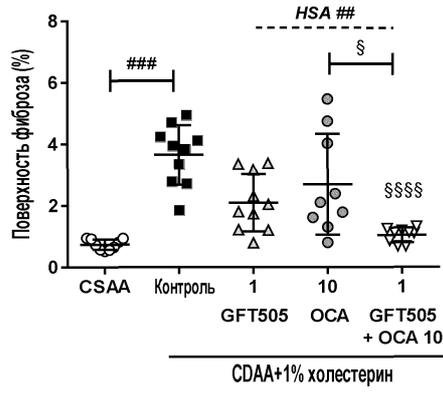
ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 40 до 60 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 5 до 12,5 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 32 до 48 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 4 до 10 мг/сутки;

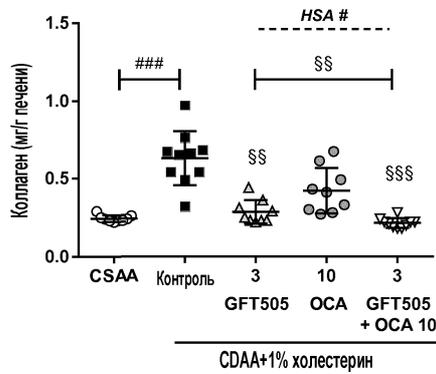
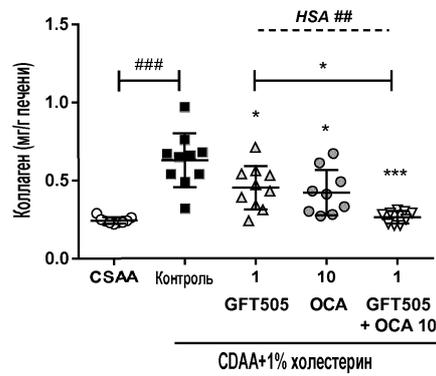
ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 27 до 40 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 3 до 8 мг/сутки;

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 16 до 24 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 2 до 5 мг/сутки; или

ELA вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 8 до 12 мг/сутки, и ОСА вводят в дозе, лежащей в диапазоне от 1 до 2,5 мг/сутки.

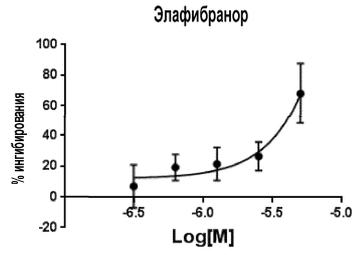


Фиг. 1

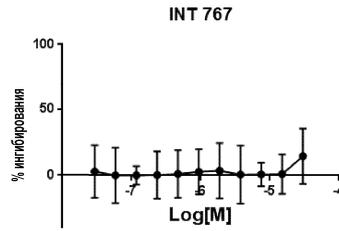


Фиг. 2

A



B



Фиг. 4

A

Экспериментальный % ингибирования

		INT767												
		0	0,03	0,06	0,12	0,23	0,47	0,94	1,88	3,75	7,5	15	30	
Элафибранор	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	
	0,3	1	19	22	24	13	19	11	23	18	22	21	52	
	0,6	9	28	21	25	30	38	22	25	24	22	32	26	
	1,3	22	27	17	34	19	36	34	29	25	39	37	31	
	2,5	26	45	51	53	55	62	62	69	65	64	61	67	
	5,0	68	76	65	66	70	69	72	67	66	80	80	81	



B

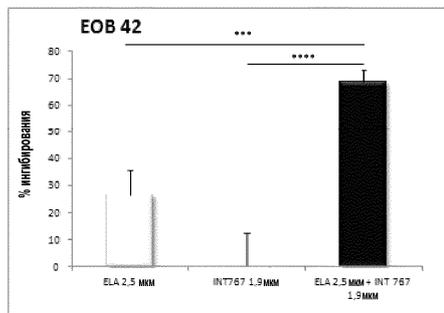
Приращение по Блиссу

		INT767												
		0	0,03	0,06	0,12	0,23	0,47	0,94	1,88	3,75	7,5	15	30	
Элафибранор	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,3	-	18	21	22	12	18	10	21	16	21	20	38	
	0,6	-	19	12	16	21	29	13	16	15	13	23	5	
	1,3	-	5	-5	13	-3	15	13	7	3	17	15	-1	
	2,5	-	19	25	27	29	35	35	42	39	38	34	31	
	5,0	-	7	-3	-3	2	1	4	-1	-2	12	12	9	

Суммарный показатель EOB 870



C



Фиг. 5

