



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.20

(21) Номер заявки
201992151

(22) Дата подачи заявки
2018.03.13

(51) Int. Cl. *A61K 31/426* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 17305268.9; 17190723.1; 18305149.9

(32) 2017.03.13; 2017.09.12; 2018.02.13

(33) EP

(43) 2020.02.06

(86) PCT/EP2018/056310

(87) WO 2018/167103 2018.09.20

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

(72) Изобретатель:
Хам Дин, Вальчак Роберт, Беланже
Кароль, Фукар Коринн (FR)

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

(56) WO-A2-2010121128
WO-A2-2009023509
US-A1-2013337055
WO-A1-9619220

XU TAN ET AL. "Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 11, 14 October 2012 (2012-10-14), pages 1125-1130, XP055065730, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2391, abstract, page 1127, left-hand column, last paragraph - page 1128, left-hand column, line 6

WO-A2-2013082469
WO-A1-2016123073

X. DE LA TRIBONNIÈRE ET AL. "Oral nitazoxanide and paromomycin inhalation for systemic

cryptosporidiosis in a patient with AIDS", INFECTION, vol. 27, no. 3, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 232-232, XP055468939, Berlin/Heidelberg ISSN: 0300-8126, DOI: 10.1007/BF02561540 page 232, left-hand column, lines 1-2,13-19

US-A1-2004122016

JOACHIM MÜLLER ET AL. "Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 123, no. 8, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 1797-1806, XP055451625, US ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.23755 abstract

PESCE EMANUELA ET AL. "Synthesis and structure-activity relationship of aminoarylthiazole derivatives as correctors of the chloride transport defect in cystic fibr", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 99, 28 May 2015 (2015-05-28), pages 14-35, XP029222666, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2015.05.030, abstract, page 19; table 3; compounds 16a, 16b, 16d

LEE H.Y. ET AL. "A small compound that inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 upregulation", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, AMSTERDAM, NL, vol. 336, no. 2, 21 October 2005 (2005-10-21), pages 716-722, XP027203749, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2005.08.154, [retrieved on 2005-09-14], abstract, page 718; figure 1

WO-A1-2017178173

WO-A1-2017178172

WO-A1-2017178174

(57) Изобретение относится к фармацевтическому комбинированному продукту, включающему: компонент (i), выбранный из тазоксанида, тизоксанида, [(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноата; или 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1) этаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата; или фармацевтической соли вышеуказанного соединения; и компонент (ii), где компонент (ii) представляет собой GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452) или фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного соединения. Настоящее изобретение также относится к применению указанного комбинированного

продукта в терапии, в частности для лечения фиброзного заболевания и целого ряда других заболеваний.

044654 B1

044654 B1

Изобретение относится к комбинированной терапии воспалительных, метаболических, фиброзных и холестатических заболеваний.

Было показано, что [2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил]этанوات (или нитазоксанид, или NTZ), впервые описанный в 1975 году (Rossignol and Cavier 1975) является высокоэффективным против анаэробных протозойных, гельминтов и широкого спектра микробов, включая как анаэробные, так и аэробные бактерии (Rossignol and Maisonneuve 1984; Dubreuil, Houcke et al. 1996; Megraud, Occhialini et al. 1998; Fox and Saravolatz 2005; Pankuch and Appelbaum 2006; Finegold, Molitoris et al. 2009). Он был впервые исследован у человека для лечения кишечных цестод (Rossignol and Maisonneuve 1984) и в настоящее время является лицензированным препаратом в США (Alinia®, Romark laboratories) для лечения диареи, вызванной протозойными паразитами *Cryptosporidium parvum* и *Giardia intestinalis*. NTZ также широко представлен на рынке в Латинской Америке и в Индии, где он показан для лечения широкого спектра кишечных паразитарных инфекций (Hemphill, Mueller et al. 2006). Предполагаемым механизмом действия, по которому NTZ проявляет свою антипаразитическую активность, является ингибирование зависимых от фермента пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (PFOR) реакций с переносом электронов, которые необходимы для анаэробного метаболизма (Hoffman, Sisson et al. 2007). NTZ также проявляет активность против *Mycobacterium tuberculosis*, которые не обладают гомологом PFOR, так, таким образом, предполагает альтернативный механизм действия. Действительно, авторы показали, что NTZ также может действовать как разобщающий агент, нарушающий мембранный потенциал и pH гомеостаз в организме (de Carvalho, Darby et al. 2011).

Фармакологические эффекты NTZ не ограничиваются его антипаразитической или антибактериальной активностью, и за последние годы некоторые исследования показали, что NTZ также может проявлять противовирусную активность (Di Santo and Ehrisman 2014; Rossignol 2014). NTZ препятствует вирусной репликации разными путями, включая блокирование созревания гемагглютининового (грипп) или VP7 (ротавирус) белков или активации белка PKR, вовлеченного во врожденный иммунный ответ (см. обзор (Rossignol 2014)). Также было показано, что NTZ обладает широкими противораковыми свойствами, вмешиваясь в ключевые метаболические и проапоптозные сигнальные пути ((Di Santo and Ehrisman 2014).

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому комбинированному продукту, включающему:

компонент (i), выбранный из нитазоксанида, тизоксанида, [(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноата; или 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1) этаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата; или из фармацевтической соли вышеуказанного соединения; и

компонент (ii), где компонент (ii) представляет собой GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452) или фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного соединения.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения фармацевтический комбинированный продукт представляет собой композицию, включающую компоненты (i) и (ii) и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом предпочтительном варианте настоящего изобретения фармацевтический комбинированный продукт представляет собой набор из частей, включающий компоненты (i) и (ii), для последовательного, раздельного или одновременного использования.

В ещё одном другом предпочтительном варианте настоящего изобретения компоненты (i) и (ii) фармацевтического комбинированного продукта сформулированы в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или в виде галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.

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

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к применению указанного фармацевтического комбинированного продукта для лечения фиброзного заболевания.

В частности, фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, мужских половых желез, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечника, тонкого кишечника, желчных путей, мягкой ткани, средостения или ретроперитонеального пространства, костного мозга, сустава и желудка, в частности, из фиброза печени, кишки, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягкой ткани, костного мозга, кишечника, глаза и сустава.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к применению указанного фармацевтического комбинированного продукта для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), лекарственно-индуцированных заболеваний печени, алкогольных болезней печени,

инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутривнутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, желудочно-кишечного рака, гастрального рака, колоректального рака, индуцированного метаболическим заболеванием фиброза или цирроза печени, NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, вызванного алкоголем фиброза или цирроза печени, лекарственно-индуцированного фиброза или цирроза печени, инфекционно-индуцированного фиброза или цирроза печени, индуцированного паразитарной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного бактериальной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного вирусной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HBV-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV- и ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного лучевой или химиотерапией фиброза или цирроза, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени в результате любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, индуцированного болезнью Крона фиброза, индуцированного язвенным колитом фиброза, фиброза кишечника фиброза тонкого кишечника, фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легкого, фиброза легкого, являющегося следствием хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, пневмофиброза, идиопатического пневмофиброза (IPF).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что NTZ, синтетическое антипротозойное средство, или его производные или его метаболиты в комбинации с анти-NASH, антифиброзным или антихолестатическим средством демонстрируют терапевтические активности, которые полезны в терапии, в частности для лечения иммунных, воспалительных, метаболических, фиброзных или холестатических заболеваний.

В соответствии с настоящим изобретением, термин "аутоиммунные заболевания" используется для обозначения состояния, которое возникает в результате аномального иммунного ответа организма против веществ и тканей, обычно присутствующих в организме. Заболевание может быть ограничено определенными органами (например, при диабете I типа или аутоиммунном тиреоидите) или может затрагивать определенную ткань в разных местах (например, при болезни Гудпасчера, поражение базальной мембраны в легких и почках).

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

В соответствии с настоящим изобретением, термины "фиброз", "фиброзное заболевание", "фиброзное расстройство" и формы их склонения означают патологическое состояние чрезмерного отложения фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Более конкретно, фиброз представляет собой патологический процесс, определяемый персистентным образованием фиброзных рубцов и сверхпродукцией внеклеточного матрикса соединительной тканью как ответ на повреждение ткани. Физиологически, отложение соединительной ткани может уничтожить архитектуру и функцию подлежащего органа или ткани.

В соответствии с настоящим изобретением, фиброз или фиброзное расстройство могут быть связаны с фиброзом любого органа или ткани. Иллюстративные, не ограничивающие, примеры фиброза конкретного органа включают фиброз печени, кишечника, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легких, матки, нервной системы, мужских половых желез, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или ретроперитонеального пространства), костного мозга, суставов или желудка, в частности фиброз печени, почек, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышц, сухожилий, хрящей, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, мужских половых желез, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечника (например, тонкого кишечника), желчных путей, мягких тканей (например, средостения или ретроперитонеального пространства), костного мозга, сустава, глаза или желудка.

В соответствии с настоящим изобретением, термины "холестаз" или "холестатическое заболевание" или "холестатическое расстройство" и формы их склонения означают патологическое состояние, определяемое уменьшением потока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами или обструкции потока желчи через внутри-или внепеченочные желчные протоки. Поэтому клиническое определение холестаза включает любое состояние, при котором вещества, которые обычно выводятся с желчью, удерживаются.

В конкретном варианте осуществления фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, кишечника, легких, сердца, почек, мышц, кожи, мягких тканей (например, средостения или ретроперитонеального пространства), костного мозга, кишечника и сустава (например, коленного, плечевого или других суставов).

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

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения подлежащее лечению фиброзное расстройство выбрано из группы, состоящей из следующего неисчерпывающего перечня фиброзных расстройств: неалкогольный стеатогепатит (NASH), пневмофиброз, идиопатический пневмофиброз, фиброз кожи, фиброз глаз (такой как капсулярный фиброз), эндомикардиальный фиброз, медиастиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессирующий фиброз (осложнения пневмокониоза у шахтеров), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, фиброз легкого, являющийся следствием хронического воспалительного заболевания дыхательных путей (ХОБЛ, астма, эмфизема, легкое курильщика, туберкулез), алкоголь- или лекарственно-индуцированный фиброз печени, цирроз печени, индуцированный инфекцией фиброз печени, индуцированный лучевой или химиотерапией фиброз, нефрогенный системный фиброз, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродерма/системный склероз, артрофиброз, некоторые формы адгезивного капсулита, хронические фиброзирующие холангиопатии, такие как первичный склерозирующий холангит (PSC) и первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутрипеченочный холестаза типа 3 (PFIC3), периимплантационный фиброз и асбестоз.

Холестаза определяется как уменьшение потока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами (гепатоцеллюлярный холестаза) или обструкции потока желчи через внутри- или внепеченочные желчные протоки (обструктивный холестаза). В клинической практике холестаза определяется как любое состояние, при котором отток желчи из печени замедляется или блокируется. В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения, холестатическое заболевание выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного холангита (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), внутрипеченочного холестаза беременных, прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза, билиарной атрезии, желчнокаменной болезни, инфекционного холангита, холангита, ассоциированного с гистиоцитозом клеток Лангерганса, синдрома Алажиля, внесиндромной недостаточности протоков, лекарственно-индуцированного холестаза и ассоциированного с полным парентеральным питанием холестаза. В предпочтительном варианте осуществления холестатическим заболеванием является PBC или PSC, в частности PBC.

Примеры воспалительных заболеваний, фиброзных заболеваний, метаболических заболеваний и холестатических заболеваний включают метаболические заболевания печени, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), лекарственно-индуцированные заболевания печени, алкогольные болезни печени, инфекционные 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 холестаза типа 3 (PFIC3), воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, келоид, перенесенный инфаркт миокарда, склеродерму/системный склероз, воспалительные заболевания, нейродегенеративные заболевания, рак, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, желудочно-кишечный рак, гастриальный рак, менингиому, ассоциированную с нейрофиброматозом, панкреатические нейроэндокринные опухоли, панкреатические экзокринные опухоли, лейкоз, миелопролиферативные/миелодиспластические заболевания, мастоцитоз, дерматофибросаркому, солидные опухоли, включая рак молочной железы, легкого, щитовидной железы или колоректальный рак, рак предстательной железы, фиброз или цирроз печени любого происхождения, индуцированный метаболическим заболеванием фиброз или цирроз печени, NAFLD-индуцированный фиброз или цирроз, NASH-индуцированный фиброз или цирроз, вызванный алкоголем фиброз или цирроз печени, лекарственно-индуцированный фиброз или цирроз печени, инфекционно-индуцированный 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 HBV-инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный HCV-инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный ВИЧ-инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный HCV- и ВИЧ-инфекцией фиброз или цирроз печени, индуцированный лучевой или химиотерапией фиброз или цирроз, фиброз желчных путей, фиброз или цирроз печени в результате любого хронического холестатического заболевания, фиброз кишечника любой этиологии, индуцированный болезнью Крона фиброз, индуцированный язвенным колитом фиброз, фиброз кишечника (например, тонкого кишечника), фиброз толстой кишки, фиброз желудка, фиброз кожи, фиброз эпидермиса, эндодермальный фиброз, фиброз кожи в результате склеродермы/системного склероза, фиброз легкого, фиброз легкого, являющийся следствием хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, пневмофиб-

роз, идиопатический пневмофиброз (IPF), фиброз сердца, фиброз почки, нефрогенный системный фиброз, мышечный фиброз, фиброз мягких тканей (например, средостения или ретроперитонеального пространства), фиброз костного мозга, артрофиброз, фиброз сухожилий, фиброз хрящевой ткани, фиброз поджелудочной железы, фиброз матки, фиброз нервной системы, фиброз мужских половых желез, фиброз яичников, фиброз надпочечников, фиброз артерий, фиброз вен, фиброз глаз, эндомикардиальный фиброз, медиастиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, массивный прогрессирующий фиброз (осложнения пневмокозиоза у шахтеров), пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, перимплантационный фиброз и асбестоз, артрофиброз, адгезивный капсулит.

Предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), лекарственно-индуцированных заболеваний печени, алкогольных болезней печени, инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома X, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертонии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутрипеченочный холестаз типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, желудочно-кишечного рака, гастриального рака, колоректального рака, индуцированного метаболическим заболеванием фиброза или цирроза печени, NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, вызванного алкоголем фиброза или цирроза печени, лекарственно-индуцированного фиброза или цирроза печени, инфекционно-индуцированного фиброза или цирроза печени, индуцированного паразитарной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного бактериальной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного вирусной инфекцией фиброза или цирроза, индуцированного HBV-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV- и ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного лучевой или химиотерапией фиброза или цирроза, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени в результате любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, индуцированного болезнью Крона фиброза, индуцированного язвенным колитом фиброза, фиброза кишечника (например, тонкого кишечника), фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легкого, фиброза легкого, являющегося следствием хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, пневмофиброза, идиопатического пневмофиброза (IPF).

Термин "лечение" или "осуществлять лечение" относится к терапевтическому или профилактическому лечению расстройства у субъекта, нуждающемуся в этом. Лечение включает введение соединения, в частности включенного в фармацевтическую композицию, субъекту, имеющему заявленное расстройство, т.е. пациенту, для лечения, задержки, реверсии или замедления прогрессирования расстройства, улучшая таким образом состояние субъекта. Лечение также может привести к облегчению симптомов, ассоциированных с расстройством, или остановить дальнейшее прогрессирование или ухудшение этих симптомов. Лечение также можно вводить здоровому субъекту или имеющему риск развития холестатического или фиброзного расстройства для предотвращения или задержки развития расстройства.

Поэтому лечение иммунного, воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания включает введение комбинации по настоящему изобретению, например в форме фармацевтической композиции, содержащей компоненты (i) и (ii) комбинации, субъекту, имеющему заявленное расстройство, для лечения, задержки, реверсии или замедления прогрессирования расстройства, улучшая таким образом состояние пациента, или здоровому субъекту, в частности субъекту, имеющему риск развития такого заболевания.

Лечение включает введение комбинации по изобретению пациенту, имеющему заявленное расстройство, для лечения, задержки или замедления прогрессирования, улучшая таким образом состояние пациента, или здоровому субъекту, в частности субъекту, имеющему риск развития воспалительного, метаболического, фиброзного и холестатического заболевания.

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

Субъекты, которых лечат, могут быть выбраны на основе нескольких критериев, ассоциированных с воспалительными, метаболическими, фиброзными и холестатическими заболеваниями, таких как предшествующее лекарственное лечение, связанные патологии, генотип, воздействие факторов риска, вирусная инфекция, а также любой другой соответствующий биомаркер, который можно оценить методами визуализации и иммунологическими, биохимическими, ферментативными, химическими или осно-

ванными на нуклеиновых кислотах методами детекции.

Синтез NTZ или аналогов можно, например, осуществить, как описано в (Rossignol and Cavier 1975), или любым другим способом синтеза, известным специалистам в данной области.

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

Эти композиции могут также включать один или несколько агентов или наполнителей, выбранных из диспергаторов, солюбилизующих веществ, стабилизаторов, консервантов и т.д. Агенты или наполнители, используемые для этих композиций (жидких и/или инъектируемых и/или твердых), представляют собой, в частности, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, полисорбат 80, маннит, желатин, лактозу, растительные масла, аравийскую камедь, липосомы и т.д.

Эти композиции могут быть сформулированы в форме инъектируемых суспензий, гелей, масел, мазей, пилюль, таблеток, суппозиторий, порошков, гелевых капсул, капсул, аэрозолей и т.д., в некоторых случаях с использованием галеновых форм или устройств, обеспечивающих пролонгированное и/или замедленное высвобождение. Для такого типа композиций предпочтительно использовать такие вещества, как целлюлоза, карбонаты или крахмалы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями и в разных формах. Например, соединение(соединения) можно вводить системным путем, перорально, парентерально, путем ингаляции, при помощи назального спрея, назальной инстилляции или инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, чрескожным путем, местным путем, интраартериальным путем и т.д.

Конечно, путь введения адаптируют в соответствии с формой компонента (i) в комбинации с одним или несколькими компонентами (ii), такими как GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452), в соответствии с процедурами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Компонент (i) в комбинации с одним или несколькими компонентами (ii), такими как GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452) R, вводят в терапевтически эффективном количестве. В контексте настоящего изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, достаточному для обеспечения желаемого терапевтического результата.

Частоту введения и/или дозу может регулировать специалист в данной области техники в зависимости от пациента, патологии, формы введения и т.д. Типично, комбинацию (например, в форме фармацевтической композиции или набора из частей) по настоящему изобретению можно вводить для лечения фиброзного заболевания при дозе для компонента (i) или компонента (ii), такого как GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452), составляющей от 0,01 мг/день до 4000 мг/день, такой как от 50 мг/день до 2000 мг/день, и особенно от 100 мг/день до 1000 мг/день.

В другом предпочтительном варианте осуществления активные ингредиенты вводят в виде одной или нескольких фармацевтических композиций в форме пилюли, предназначенной для перорального приема.

Введение можно осуществлять ежедневно или даже несколько раз в день, при необходимости.

Изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Описание чертежей и таблиц

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

Лишенные сыворотки HSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с Элафибранором (A), или Нитазоксанидом (B), или Безафибратом (C) перед активацией профиброгенным цитокином TGFβ1 (1 нг/мл). После 48 часов инкубации экспрессию α-SMA измеряли методом ELISA. Полученные значения преобразовывали в процент ингибирования по сравнению с TGFβ1 контролем. Данные представлены в виде среднего значения (анализ в трех повторах) ± стандартное отклонение (SD). Подгонку кривой и расчет полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) осуществляли с использованием программы XLFit 5.3.1.3.

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

Комбинации испытывали в формате доза-ответ и анализировали в соответствии с моделью аддитивных приращений по Блисссу (EOB). Получали серийные разведения Элафибранора (ряды) и Нитазоксанида (колонки), включая их соответствующие DMSO контроли. Полученные смеси добавляли к лишенным сыворотки HSC за 1 час до активации профиброгенным цитокином TGFβ1 (1 нг/мл). (A) Процент ингибирования α-SMA по сравнению с TGFβ1 контролем для всех пар комбинации. Данные представлены в виде среднего значения от четырех повторов анализа. (B) EOB оценки рассчитывали, как

описано в Материалах и Методах. Любую пару соединений с положительным ЕОВ значением считали синергетической (цвет от светло-серого до черного). Также рассчитывали общую ЕОВ оценку, включая все комбинации. (С) Значения данных, полученные от пары, представляющей собой синергетическую комбинацию, использовали для построения графика, представленного в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в виде среднего значения (анализа в четырех повторах) \pm стандартное отклонение (SD). ЕОHSA модель использовали, как описано в разделе Материалы и Методы, для подтверждения синергизма выбранных используемых в комбинации NTZ/ELA пар.

Фиг. 3: Содержание коллагена в печени.

6-Недельные C57BL/6 мыши получали контрольный корм (CSAA), CDAA+1% хол. (CDAAc) корм или CDAAc корм, дополненный NTZ (30 мг/кг/день или 100 мг/кг/день в течение 12 недель) или Элафибранором (1 мг/кг/день или 3 мг/кг/день) или комбинацией Элафибранора и NTZ (соответственно 1+30 мг/кг/день, 1+100 мг/кг/день, 3+30 мг/кг/день и 3+100 мг/кг/день).

Для каждого графика указана точная величина экспозиционных доз.

После умерщвления животных определяли содержание коллагена в печени.

Фиг. 4: Процент фиброза ткани печени.

6-Недельные C57BL/6 мыши получали контрольный корм (CSAA) корм, CDAA+1% хол. (CDAAc) корм или CDAAc корм, дополненный NTZ (30 мг/кг/день или 100 мг/кг/день в течение 12 недель) или Элафибранором (1 мг/кг/день или 3 мг/кг/день) или комбинацией Элафибранора и NTZ (соответственно 1+30 мг/кг/день, 1+100 мг/кг/день, 3+30 мг/кг/день и 3+100 мг/кг/день).

Для каждого графика указана точная величина экспозиционных доз.

После умерщвления животных определяли площадь фиброза печени.

Фиг. 5: Экспрессия гена α SMA в печени.

Фиг. 6: Экспрессия гена CCR2 в печени.

Фиг. 7: Экспрессия гена CCR5 в печени.

Фиг. 8: Экспрессия гена Colla2 в печени.

Фиг. 9: Экспрессия гена MMP2 в печени.

Фиг. 10: Экспрессия гена TIMP2 в печени.

Фиг. 11: Экспрессия гена TGF β 1 в печени.

Фиг. 12: Комбинация GS-0976 (A), Селонсертиба (B), GKT-831 (C), KD-025 (D), Ценикривирока (CVC) (E), Тропифексора (LJN-452) (F) и Арамхола (G) с Нитазоксанидом синергически ингибирует α -SMA в TGF β 1-индуцированных hHSC.

Комбинации испытывали в формате доза-ответ и анализировали в соответствии с моделью аддитивных приращений по Блессу (ЕОВ). Получали серийные разведения GS-0976, Селонсертиба, GKT-831, KD-025, CVC, Тропифексора (LJN-452) и Арамхола (ряд) и Нитазоксанида (колонка), включая их соответствующие DMSO контроли. Полученные смеси добавляли к лишенной сыворотки HSC за 1 час до активации профиброгенным цитокином TGF β 1 (1 нг/мл). ЕОВ оценки рассчитывали, как описано в Материалах и Методах. Любую пару соединений с положительным ЕОВ значением считали синергетической (цвет от светло-серого до черного). Значения данных, полученные от пары, представляющей собой синергетическую комбинацию, использовали для построения графика, представленного в виде столбиковой диаграммы. Данные представлены в виде среднего значения (анализа в четырех повторах) \pm стандартное отклонение (SD). ЕОHSA модель использовали, как описано в разделе Материалы и Методы, для подтверждения синергизма выбранной используемой в комбинации пары NTZ/ GS-0976 (A), Селонсертиб (B), GKT-831 (C), KD-025 (D), Ценикривирок (E), Тропифексор (F) и Арамхол (G).

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

AP-1	Активирующий белок-1
ASBTi	Ингибитор апикальных ко-транспортёров натрия-желчных кислот
ASK1	сигнал-регулирующая киназа 1
AT1	Ангиотензин 1
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких
CTGF	Фактор роста соединительной ткани
DGAT	Диацилглицерин-0-ацилтрансфераза
DMSO	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
DPP4	Дипептидилпептидаза
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
ЕОВ	Приращение по Блессу
FABAC	Конъюгаты жирных кислот с желчными кислотами
FBS	Фетальная бычья сыворотка
FGF	Фактор роста фибробластов
FXR	Фарнезойдный X рецептор
GDF	Фактор роста/дифференцировки

GLP-1	Глюкагон-подобный пептид-1
GPCR	Сопряженный с G-белком рецептор
HBV	Вирус гепатита В
HCV	Вирус гепатита С
15-HEPE	5-Гидроксиэйкозапентаеновая кислота
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
HSC	Звездчатая клетка печени
IC50	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
iNOS	Индуцируемая синтаза оксида азота
IPF	Идиопатический пневмофиброз
LBD	Лиганд-связывающий домен
LPS	Липополисахарид
LT	Лейкотриен
MAPK	Митоген-активируемые протеинкиназы
ММПаза	Матриксная металлопротеиназа
NADPH	Никотинамиддениндинуклеотидфосфат
NAFLD	Неалкогольная жировая болезнь печени
NASH	Неалкогольный стеатогепатит
NF-κB	Ядерный фактор-каппа В
NOX	NADPH оксидаза
НСПВЛС	Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства
NTZ	Нитазоксанид
PAR	Протеаза-активируемый рецептор
PBC	Первичный билиарный холангит
PDE	Фосфодиэстераза
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста
PFIC3	Прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз типа 3
PFOR	Пируват:Ферредоксин оксидоредуктаза
PPAR	Рецептор, активируемый пролифератором пероксисом
PPRE	Элементы ответа PPAR
PSC	Первичный склерозирующий холангит
ROCK	Rho-ассоциированная протеинкиназа
RTK	Рецепторная тирозинкиназа
SD	Стандартное отклонение
SGLT	Натрий-зависимый переносчик глюкозы
STAT	Переносчики сигнала и активаторы транскрипции
TGFβ	Трансформирующий фактор роста β
TGFBR1	Рецепторы TGFβ типа I
TGFBR2	Рецепторы TGFβ типа II
THBS1	Тромбоспондин 1
THR β	Рецептор тиреоидного гормона β
TIMP	Тканевый ингибитор металлопротеиназ
TLR-4	Toll-подобный рецептор 4
TZ	Тизоксанид
TZG	Тизоксанид глюкуронид
VAP-1	Белок 1 сосудистой адгезии

Примеры

Материалы и методы.

Соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Fluka cat# 41640). Ланифибранор (ARK PHARM cat# AK689102), Нитазоксанид (INTERCHIM cat#RQ550U), GKT-831 (cat#S7171, Absource Diagnostica GmbH), KD-025 (cat#S7936, Absource Diagnostica GmbH), GS-0976 (cat#HY-l6901, Haoyuan Chemexpress Co), GS-4997 или Селонсертиб (cat#S8292, Absource Diagnostica GmbH), Арамхол (cat#A765150, Toronto Research Chemical (TRC)), Тропифексор (LJN-452, cat# HY-107418 Haoyuan Chemexpress Co), Ценикривирок (PB0001630-239-01/PBLJ6483, Pharmablock), Налмефен (cat#N284400, TRC) и PBI-4050 (cat#ACDS-072808, Acadechem) получали коммерческим путем.

hHSC культура.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (InnoproT) культивировали в STeCM среде (ScienCell cat# 5301), дополненной 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS, ScienCell cat# 0010), 1% пенициллина/стрептомицина (ScienCell cat# 0503) и добавкой для роста звездчатых клеток (SteCGS; ScienCell

cat# 5352). Колбы с клеточной культурой покрывали поли-L лизином (Sigma cat# P4707) для лучшей адгезии.

Получение композиций.

Матрица для 2-компонентной комбинации (NTZ/компонент (ii)).

Для этих экспериментов была создана матрица, имеющая шахматную конфигурацию. Исходные растворы NTZ и выбранного компонента (ii) серийно разводили в DMSO в 5-точечной серии в ряду (компонент (ii)) и 6-точечной серии в колонке (NTZ) 96-луночного планшета. Затем получали 5X6 комбинационную матрицу путем 1:1 смешивания всех концентраций отдельного средства. Испытываемые концентрации для каждого соединения выбирали на основании соответствующего значения IC_{50} каждого соединения в виде отдельного средства, полученных путем измерения содержания α -SMA в HSC модели, стимулированной TGF- β 1. Затем выбирали в 2 и 4 раза большие и меньшие концентрации.

Активация hHSC посредством TGF- β 1 и обработка соединением.

Первичные звездчатые клетки печени человека (hHSC) (Innoprot) культивировали в стандартных условиях, как описано выше. Клетки затем высевали при плотности 2×10^4 клеток/лунка в 96-луночные планшеты для измерения α -SMA методом ELISA. На следующий день среду для культивирования клеток удаляли и клетки промывали PBS (Invitrogen cat# 14190). hHSC подвергали депривации в течение 24 часов в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде. Для обработок NTZ, Элафибранором, компонентом (ii) и соответствующими комбинациями NTZ/компонент (ii) или Элафибранор, лишённые сыворотки hHSC предварительно инкубировали в течение 1 часа с соединениями, затем с добавлением профиброгенных стимулов TGF- β 1 (PeproTech cat# 100-21, 1 нг/мл) в бессывороточной и не содержащей SteCGS среде еще в течение 48 часов.

α -SMA ELISA.

Уровень α -SMA измеряли с использованием сэндвич-варианта ELISA. Вкратце, лунки ELISA планшета сначала покрывали иммобилизованным антителом (мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) при 4°C в течение ночи. После 3 промывок в PBS+0,2% Tween 20 добавляли блокирующий раствор, состоящий из PBS+0,2% BSA, в течение одного часа, с последующим осуществлением еще одного промывочного цикла. Клеточные лизаты переносили в лунки для связывания с иммобилизованным антителом в течение 2 часов при комнатной температуре. После процедуры промывки добавляли детекторное антитело (биотинилированное мышинное моноклональное анти-ACTA2, Abnova) в течение 2 часов при комнатной температуре, с последующим 3 промывками. Для детекции сначала наносили HRP-конъюгированный Стрептавидин (R&D Systems cat# DY998) в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки добавляли HRP субстрат TMB (BD, #555214) и инкубировали в течение 7 минут при комнатной температуре в темноте. При окислении TMB образует водорастворимый синий реакционный продукт, который становится желтым при добавлении серной кислоты (стоп-реагент), что позволяет точно измерить интенсивность при 450нм с использованием спектрофотометра. Проявляющийся цвет прямо пропорционален количеству α -SMA, которое присутствует в лизате.

Определение синергизма методом приращения по Блисссу (EOB) и подтверждение при помощи EOHSA (превышение по сравнению с наивысшим показателем для отдельного средства).

Значения, полученные в ELISA анализах α SMA, сначала преобразовывали в проценты ингибирования по сравнению с TGF- β 1 контролем. Затем с использованием этих процентов ингибирования определяли EOB (приращение по Блисссу) для определения синергетических эффектов комбинаций лекарственных средств. Ожидаемую оценку аддитивизма по Блисссу (E) сначала определяли с использованием уравнения:

$E = (A+B) - (A \times B)$, где A и B представляют собой процент ингибирования для NTZ (A) и компонента (ii) или Элафибранора (B) при данной дозе. Разница между ожидаемым значением по Блисссу и наблюдаемым ингибированием для комбинации NTZ/компонент (ii) или Элафибранор при одной и той же дозе представляет собой оценку 'Приращения по Блисссу'.

Оценка приращения по Блисссу=0 означает, что лечение с использованием комбинации является аддитивным (как ожидалось для эффектов независимых путей);

Оценка приращения по Блисссу >0 означает, что активность больше чем аддитивная (синергизм); и

Оценка приращения по Блисссу <0 означает, что комбинация является меньше чем аддитивной (антагонизм).

Для комбинации NTZ+компонент (ii) или Элафибранор рассчитывали дополнительную общую оценку по Блисссу путем суммирования всех EOB.

EOHSA представляет собой стандартный показатель синергизма, используемый FDA для оценки комбинаций лекарственных средств, и рассчитывается как разница между эффектом, обеспечиваемым комбинацией лекарственных средств, и наибольшим эффектом, обеспечиваемым каждым из отдельных средств этой комбинации при тех же концентрациях, что и в комбинации (Vorisy et al., 2003). Для синергетических комбинаций, определенных методом EOB, экспериментальный % ингибирования использовали для построения графика в виде столбиковой диаграммы и значимость наблюдаемой разницы между NTZ/компонент (ii) или Элафибранор и отдельными средствами оценивали при помощи однофакторного

дисперсионного анализа и нескорректированной наименьшей значимой разности по Фишеру с использованием апостериорного критерия (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Оценка Элафибранора, Нитазоксанида и комбинации Элафибранор+Нитазоксанид в модели индуцированного длительной диетой CDAA+1% холестерина фиброзирующего NASH (12 недель).

План эксперимента.

Диета с дефицитом холина и L-аминокислот (CDAA) не содержит холина, который является существенным для печеночного β -окисления и продукции липопротеинов очень низкой плотности, и считают, что она может индуцировать гепатоциты к накоплению жира и затем вызывать повреждение клеток. В индуцируемой CDAA диетой модели на грызунах в течение относительно короткого периода времени развивается фиброз, что является идеальным для быстрого исследования обратимости NASH патологии, в частности фиброза.

Повышенное потребление холестерина ускоряет фиброз печени в некоторых мышинных моделях NASH. Обострение фиброза печени преимущественно включает аккумуляцию свободного холестерина в звездчатых клетках печени, что сенсibiliзирует клетки к трансформирующему ростовому фактору β (TGF β) и затем усугубляет фиброз печени.

В настоящем испытании авторы исследовали эффекты нитазоксанида на фиброз печени у C57B1/6J мышей, которым давали CDAA корм, дополненный 1% холестерина.

Профилактические эффекты отдельного средства, NTZ отдельно и комбинации обоих средств оценивали на модели фиброзирующего NASH у мышей, которых выдерживали на диете CDAA+1% холестерина, 6-Недельные самцы C57B1/6J мышей получали контрольный корм (CSAA), корм CDAA+1% холестерина или корм CDAA+1% холестерина, дополненный 1 и 3 мг/кг/день, NTZ 30 и 100 мг/кг/день или комбинацией лекарственных средств (1 и 3 мг/кг/день в комбинации с NTZ 30 и 100 мг/кг/день) в течение 12 недель.

Массу тела и потребление пищи контролировали два раза в неделю. В последний день лечения мышей умерщвляли после 6-часового периода голодания. Печень быстро вырезали для биохимического и гистологического исследования.

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

6-Недельных C57BL/6 самцов мышей кормили в течение 12 недель в соответствии с планом эксперимента, подробно описанным в табл. 1:

Таблица 1
План эксперимента

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

В качестве контроля использовали CSAA диету.

Некоторых мышей содержали на CDAAs диете.

Некоторых мышей содержали на CDAAs диете, дополненной Элафибранором при 1 или 3 мг/кг/день.

Некоторых мышей содержали на CDAAs диете, дополненной NTZ при 30 или 100 мг/кг/день.

Некоторых мышей содержали на CDAAs диете, дополненной комбинацией Элафибранор+NTZ при разных соотношениях: 1+30, 1+10, 3+30 и 3+100 мг/кг/день.

Группу, соответствующую CDAAs диете, дополненной NTZ при 30 мг/кг, также определяют как C57B1/6J мышей на CDAA диете+нитазоксанид 0,02% (масс/масс), соответствующей теоретической дозе 30 мг/кг/день.

Группу, соответствующую CDAAs диете, дополненной NTZ при 100мг/кг, также определяют как C57B1/6J мышей на CDAA диете+нитазоксанид 0,0667% (масс/масс), соответствующей теоретической дозе 100 мг/кг/день.

Корм закупали у компании Ssniff® (Soest, Germany).

Нитазоксанид (см. справочную информацию в табл. 1) был включен компанией Ssniff® в корм CDAA+1% хол. в порошкообразной форме до требуемой дозы.

Справочные данные и номер партии нитазоксанида представлены в табл. 2:

Таблица 2
Справочные данные о нитазоксаниде

Соединение (INN)	Код лаборатории		Поставщик	Обозначение	Партия
	Внешний идентификатор	Идентификатор Genfit			
Нитазоксан ид	GFE 50455	GSL022597.08	Interchim	RQ550	

Для каждой дозы расчет точных доз осуществляли в соответствии со следующим примером. Это позволяет учитывать точную дозу каждого продукта, конкретно употребляемую каждой группой мышей.

Расчет фактических доз для лечения: пример с нитазоксанидом 0,02% (масс/масс).

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

0,02% нитазоксанида в корме,

0,02 г соед./100 г пищи=0,2 мг соед./г пищи.

Фактическая доза соед.:

0,2 мг соед./грамм пищи/грамм животного/день,

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

Следовательно, умножив на 200 значение потребления пищи, выраженное в граммах пищи/грамм животного/день, получают значение, соответствующее фактической вводимой дозе, выраженной как мг NTZ/кг животного/день.

Таким же образом:

Для дозы NTZ 0,00667% масс/масс, фактическую дозу для лечения получали путем умножения значения потребления пищи (граммов пищи/граммов животного/день) на 66,7.

Для дозы NTZ 0,0667% масс/масс, фактическую дозу для лечения получали путем умножения значения потребления пищи (граммов пищи/граммов животного/день) на 667.

В соответствии с этим расчетом, в следующих табл. 3 и 4 представлены рассчитанная доза против предполагаемой дозы.

Таблица 3

Предполагаемые и рассчитанные дозы для каждого соединения при разных дозах

Группы	GFT505		NTZ	
	1 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела	30 мг/кг массы тела	100 мг/кг массы тела
Предполагаемые дозы	1 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела	30 мг/кг массы тела	100 мг/кг массы тела
Рассчитанные дозы	1 мг/кг массы тела	2,8 мг/кг массы тела	26,3 мг/кг массы тела	78,1 мг/кг массы тела

Таблица 4

Предполагаемые и рассчитанные дозы для каждой комбинации при разных дозах

Группы	Комб. 1		Комб. 2		Комб. 3		Комб. 4	
	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ	GFT505	NTZ
Предполагаемые дозы	1 мг/кг массы тела	30 мг/кг массы тела	1 мг/кг массы тела	100 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела	30 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела	100 мг/кг массы тела
Рассчитанные дозы	0,9 мг/кг массы тела	26,4 мг/кг массы тела	0,9 мг/кг массы тела	79,4 мг/кг массы тела	2,9 мг/кг массы тела	27,4 мг/кг массы тела	2,8 мг/кг массы тела	77,7 мг/кг массы тела

Массу тела и потребление пищи регистрировали два раза в неделю в течение всего периода испытания.

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

Образцы крови брали перед умерщвлением после 6-часового периода голодания. Образцы крови брали под анестезией путем ретроорбитальной пункции. Пробирки с гепарином, содержащие кровь, быстро центрифугировали (15 минут при 4000 об/мин/4°C) и собирали фракцию плазмы. Аликвоты плазмы хранили при -20°C до последующих анализов.

Биохимия плазмы крови.

Аланинаминотрансфераза (ALT).

Концентрацию ALT в плазме А определяли с использованием соответствующего набора Randox для автоматического анализатора Daytona (Randox, cat#AL 3801). Вкратце, ALT в образце плазмы ферментативно преобразует α -оксоглутарат и L-аланин в L-глутамат и пируват. В присутствии NADH образовавшийся пируват преобразуется лактатдегидрогеназой с образованием L-лактата и NAD^+ . Кинетика реакции изучена и позволяет рассчитать уровень ALT в плазме. Результаты выражены в ед./л.

Аспарагинаминотрансфераза (AST).

Концентрацию AST в плазме определяли с использованием соответствующего набора Randox для автоматического анализатора Daytona (Randox, caAS 3804). Вкратце, AST в образце плазмы ферментативно преобразует α -оксоглутарат и L-аспарагин в L-глутамат и оксалоацетат. В присутствии NADH образовавшийся оксалоацетат преобразуется малатдегидрогеназой с образованием L-малата и NAD^+ . Кинетика реакции изучена и позволяет рассчитать уровень AST в плазме. Результаты выражены в ед./л.

Гистология.

После умерщвления животных образцы печени обрабатывали для гистологического анализа и исследовали, как описано ниже.

Заливка тканей и секционирование.

Срезы печени сначала фиксировали в течение 12 часов в 4% растворе формалина. Затем кусочки печени промывали 30 минут в PBS и дегидратировали в этанольных растворах (последовательные ванны при 70, 80, 95 и 100% этанола). Кусочки печени инкубировали в трех разных ваннах с ксилолом (Sigma-Aldrich cat # 534056), а затем в двух ваннах в жидком парафине (60°C). Затем кусочки печени помещали в лотки, которые аккуратно заполняли Histowax®, чтобы полностью покрыть ткань.

Парафиновые блоки, содержащие кусочки ткани, вынимали из лотков и хранили при комнатной температуре. Блоки печени разрезали для получения 3 мкм срезов.

Окрашивание пикросириусом красным.

Срезы печени депарафинизировали, регидратировали и инкубировали в течение 15 минут в растворе Fast Green FCF 0,04% (Sigma-Aldrich, cat#F7258) перед промывкой в ванне с 0,5% уксусной кислотой (Sigma-Aldrich, cat#695092). Затем срезы печени промывали водой и инкубировали 30 минут в растворе Fast Green FCF 0,04% - 0,1% сириуса красного (Direct Red 80, Fluka cat#43665) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты (Sigma-Aldrich cat#P6744). Затем срезы дегидратировали и монтировали с использованием монтирующей среды CV Mount (Leica, cat#14046430011).

Гистологические исследования.

Гистологические исследования осуществлял специалист, которому не был известен источник каждого образца печени. Виртуальные слайды получали с использованием сканера Pannoramic 250 от 3D Histech. Используя программное обеспечение Quant Center (3D Histech, включая модули Pattern Quant и Histo Quant), подсчитывали коллаген-окрашенные области. Вкратце, Pattern Quant использовали для обнаружения ткани и измерения ее поверхности. Затем Histo Quant использовали для определения содержания окрашенного коллагена и измерения его поверхности на основе метода цветового порога. Площадь фиброза затем выражали как процент поверхности коллагена относительно всей ткани для каждого животного.

Определение стадий фиброза печени осуществляли вслепую, используя критерии оценки фиброза CRN.

Параметры, количественная оценка/подсчет и количество рассматриваемых областей представлены в следующей табл. 5.

Таблица 5
CRN критерии для оценки фиброза

Параметр	Оценка в баллах	Описание (рассматривали всю секцию в целом)
Фиброз	0	Отсутствие фиброза
	1	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз или портальный/перипортальный фиброз
	2	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и портальный/перипортальный фиброз
	3	Центрилобулярный перисинусоидальный/periцеллюлярный фиброз и/или портальный фиброз с очаговым или экстенсивным мостовидным фиброзом
	4	Цирроз

Статистический анализ.

Результаты экспериментов выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD) и использовали для построения графиков в виде столбиковых диаграмм или кривых. Статистические анализы осуществляли, как описано ниже:

Для параметров массы тела и потребления пищи:

С одной стороны, группы, получавшие CSAA корм и CDAA+1% хол. сравнивали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа по фактору Время, с последующим использованием теста Бонферрони, используя программу Sigma Plot 11.0 (\$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$); с другой стороны, группы лечения сравнивали с группой, получавшей CDAA+1% хол., с использованием тех же статистических анализов и программы (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Для измерений, осуществляемых после умерщвления животных, сравнивали группы CSAA vs CDAA+1% хол. с использованием t-критерия Стьюдента и программы Sigma Plot 11.0 (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) и группы лечения сравнивали с группой, получавшей CDAA+1% хол., при помощи однофакторного дисперсионного анализа, а затем теста Бонферрони, используя программу Sigma Plot 11.0 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Измерение содержания коллагена в печени.

Содержание коллагена в печени определяли с использованием соответствующего набора QuickZyme (анализ общего коллагена, кат. № QZB-totcol5). Анализ основан на детекции гидроксипролина, который является непротеиногенной аминокислотой, преимущественно присутствующей в тройной спирали коллагена. Таким образом, гидроксипролин в тканевых гидролизатах можно использовать как непосредственный показатель количества коллагена, присутствующего в ткани (без различия между проколлагеном, зрелым коллагеном и продуктами распада коллагена).

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

N-концевой пропептид проколлагена III (PIIINP).

Концентрацию PIIINP в плазме определяли с использованием анализа ELISA от Cloud-Clone Corp (cat# SEA573Ra) в соответствии с инструкциями изготовителя. Микротитровальный планшет предварительно покрывают антителом, специфическим к PIIINP. Стандарты или образцы добавляют в соответствующие лунки микротитровального планшета с биотин-конъюгированным антителом, специфическим к PIIINP. Затем в каждую лунку микропланшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. После добавления раствора субстрата ТМВ только те лунки, которые содержат PIIINP, биотин-конъюгированное антитело и фермент-конъюгированный авидин, будут показывать изменение цвета. Реакцию фермент-субстрат останавливают добавлением раствора серной кислоты и изменение цвета измеряют спектрофотометрически при длине волны $450\text{ нм} \pm 10\text{ нм}$. Концентрацию PIIINP в образцах затем определяют путем сравнения OD образцов со стандартной кривой. Результаты выражены в пг/мл.

Экспрессия генов.

Выделение РНК.

Суммарную РНК из печени выделяли с использованием набора Nucleospin® 96 (Macherey Nagel) в соответствии с инструкциями изготовителя. 150 нг суммарной РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием M-MLV-RT (обратная транскриптаза вируса лейкоза мыши Молони) (Invitrogen cat#28025) в присутствии RT-буфера 1x (Invitrogen cat#P/NY02321), 1 mM DTT (Invitrogen cat#P/NY00147), 0,5 mM dNTP (Promega), 200 нг pdN6 (Roche cat#11034731001) и 40Ед. ингибитора рибонуклеазы (Promega cat#N2515).

Затем осуществляли количественную ПЦР с использованием системы детекции ПЦР в режиме реального времени CFX96 Touch™ (Biorad). Вкратце, ПЦР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах на 5 мкл 5x разбавленной смеси для обратной транскрипции с использованием набора iQ SYBR Green Supermix (Biorad cat#170887). Условия эксперимента: объем реакции 20 мкл и по 0,5 мкл каждого из обратных и прямых праймеров (10 пМоль).

Название праймера	Последовательность ID	Последовательность (5'→3')
αSMA прямой	1	CTGACAGAGGCCACCACTGAA
αSMA обратный	2	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col1α1 прямой	3	AGGCGAACAAGGTGACAGAG
Col1α1 обратный	4	GCCAGGAGAACCAGCAGAG
Col1α2 прямой	5	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG
Col1α2 обратный	6	TTTGCCCCAGGTATGCCAG
TGFβ1 прямой	7	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA
TGFβ1 обратный	8	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TIMP1 прямой	9	ATTCAAGGCTGTGGGAAATG
TIMP1 обратный	10	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TIMP2 прямой	11	GCATCACCCAGAAGAAGAGC
TIMP2 обратный	12	GGGTCCCTCGATGTCAAGAAA
MMP2 прямой	13	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC
MMP2 обратный	14	GCTTCCAAACTTCACGCTCT
MMP7 прямой	15	TAATTGGCTTCGCAAGGAGA
MMP7 обратный	16	AAGGCATGACCTAGAGTGTTC
CCR2 прямой	17	TAATATGTTACCTCAGTTCATCCACGG
CCR2 обратный	18	TGCTCTTCAGCTTTTTACAGCSTATC
CCR5 прямой	19	ATTCTCCACACCTGTTCG
CCR5 обратный	20	GAATTCCTGGAAGGTGGTCA
GAPDH прямой	21	TATGACTCCACTCACGGCAA
GAPDH обратный	22	TCCACGACATACTCAGCACC

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

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

Результаты и выводы:

Аномальная жизнеспособность дифференцированных миофибробластов является характерной особенностью многих фиброзных заболеваний.

После повреждения печени находящиеся в состоянии покоя HSC подвергаются процессу активации, который характеризуется дифференцировкой в (α-SMA)-положительные миофибробласты.

Было показано, что NTZ в качестве отдельного средства придает антифиброзную активность в TGFβ-индуцированных hHSC (Фиг. 1B). Поскольку известно, что NTZ быстро гидролизует в его активный метаболит тизоксанид (TZ) (Broekhuysen, Stockis et al. 2000), этот метаболит также оценивали на его антифиброзную активность в HSC. TZ показал профиль, аналогичный исходному лекарственному средству (данные не показаны). С другой стороны, некоторые агонисты PPAR, такие как Элафибранор, также показали антифиброзный профиль в модели TGFβ-индуцированных HSC (Фиг. 1A). Другие агонисты PPAR, такие как безафибрат, показали слабую активность, из чего можно заключить, что агонисты PPAR не являются эквивалентными в том, что касается их антифиброзных свойств (Фиг. 1C).

Чтобы оценить, может ли комбинация Элафибранора с NTZ уменьшать фиброз синергетическим образом, осуществляли эксперименты с комбинационной матрицей в TGFβ-индуцированных HSC. Вкратце, растворы NTZ и Элафибранора серийно разводили в формате "шахматной доски" с получением матрицы с 42 комбинациями, охватывающей большую панель Элафибранор/NTZ соотношений. Синергизм сначала определяли путем расчета оценок приращения по Блисссу. Эти эксперименты показали, что NTZ может синергетически действовать с Элафибранором для уменьшения продукции α-SMA в активированных HSC. Некоторые используемые в комбинации пары показали EOB оценку больше 10, что указывает на синергизм (Фиг. 2B). Для подтверждения синергизма экспериментальные значения, соответствующие высшей EOB оценке, использовали для построения графика в виде столбиковой диаграммы (Фиг. 2C). Эти графики иллюстрируют, что комбинация NTZ с Элафибранором показывает превосходный антифиброзный эффект, который является статистически значимым по сравнению с наивысшим эффектом отдельного средства (NTZ или Элафибранора). Наиболее впечатляющим примером является комбинация NTZ при 0,6 мкМ и Элафибранора при 5 мкМ. Хотя NTZ не показывает почти никакой антифиброзной активности при 0,6 мкМ, добавление Элафибранора при 5 мкМ приводит к сильному

уменьшению α SMA на 55%, что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый с каждым средством, используемым отдельно. В заключение, заявитель обнаружил неожиданную антифиброзную активность для комбинации соединения формулы (I) с конкретным агонистом(агонистами) PPAR. Эти результаты показывают, что комбинация соединения формулы (I) с агонистом PPAR может быть синергетической и может обеспечить терапевтическую пользу при различных типах фиброзных заболеваний.

Содержание мышей на диете с дефицитом холина и дефицитом L-аминокислот (CDAА) + 1% холестерина вызывает прогрессирующий фиброзирующий стеатогепатит, который патологически аналогичен неалкогольному стеатогепатиту человека (NASH).

Диета CDAА+1% холестерина явно индуцирует существенное увеличение коллагена в печени, как показано на фиг. 3.

Эта фигура также показывает, что введение Элафибранора или NTZ отдельно снижает содержание коллагена в печени. Уменьшение коллагена пропорционально вводимой дозе Элафибранора или NTZ.

Когда вводят комбинацию Элафибранора и NTZ, уменьшение образуемого коллагена больше, чем уменьшение, наблюдаемое для каждого соединения, принимаемого отдельно.

Поэтому имеет место синергетический эффект комбинации Элафибранора и NTZ на уменьшение продукции коллагена. Иными словами, присутствует явный антифиброзный эффект, когда Элафибранор и NTZ используют в комбинации.

Лучший эффект наблюдают для комбинации, включающей Элафибранор при 2,8 мг/кг массы тела (мг на килограмм) и NTZ при 77,7 мг/кг массы тела, выраженных в виде рассчитанных доз.

Фиг. 4 представляет результаты гистологии, т.е. определение площади фиброза, которую выражали как процент поверхности коллагена относительно всей ткани для каждого животного.

Диета CDAА+1% холестерина явно индуцирует существенное увеличение процента фиброза.

Фиг. 4 также показывает, что введение Элафибранора или NTZ отдельно снижает процент фиброза. Уменьшение пропорционально вводимой дозе Элафибранора или NTZ.

Когда вводят комбинацию Элафибранора и NTZ, уменьшение в процент фиброза больше, чем уменьшение, наблюдаемое для каждого соединения, принимаемого отдельно.

Поэтому имеет место синергетический эффект комбинации Элафибранора и NTZ на уменьшение процента фиброза. Иными словами, присутствует явный антифиброзный эффект, когда Элафибранор и NTZ используют в комбинации.

Лучший эффект наблюдают для комбинации, включающей Элафибранор при 2,8 мг/кг массы тела (мг на килограмм) и NTZ при 77,7 мг/кг массы тела, выраженных в виде рассчитанных доз.

Фиг. 5-11 представляют экспрессию генов различных печеночных маркеров фиброза. Для всех маркеров, диета CDAА +1% холестерина явно индуцирует существенное увеличение экспрессии генов.

Также следует отметить, что введение Элафибранора или NTZ отдельно снижает уровень экспрессии различных генов. Уменьшение пропорционально вводимой дозе Элафибранора или NTZ.

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

Поэтому имеет место синергетический эффект комбинации Элафибранора и NTZ на уменьшение экспрессии генов различных печеночных маркеров фиброза. Иными словами, присутствует явный антифиброзный эффект, когда Элафибранор и NTZ используют в комбинации.

Для того, чтобы оценить синергизм комбинации NTZ с компонентом (ii), GS-0976, Селонсертиб (GS-4997), GKT-831, KD-025, Ценикривирок (CVC), Тропифексор (LJN-452) и Арамхол оценивали для подтверждения антифиброзной активности. Комбинация NTZ с GS-0976, Селонсертибом (GS-4997), GKT-831, KD-025, Ценикривироком, Тропифексором и Арамхолом показала EOB оценку >0, что указывает на синергизм.

Комбинация GS-0976 при 10 мкМ и NTZ при 1,25 мкМ также приводила к существенному и сильному снижению уровня α SMA на 64%, что намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый с каждым из этих средств отдельно (Фиг. 12A). Комбинация Селонсертиба (GS-4997) при 10 мкМ и NTZ при 2,5 мкМ также приводила к существенному и сильному снижению уровня α SMA на 77%, что было намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый с каждым из этих средств отдельно (фиг. 12B). Синергизм был даже еще более выраженным с комбинацией GKT-831 0,3 мкМ и NTZ при 0,3 мкМ (фиг. 12C) и с комбинацией KD-025 при 1 мкМ и NTZ при 0,3 мкМ (фиг. 12D).

Комбинация Ценикривирока при 3 мкМ и NTZ при 2,5 мкМ приводила также к существенному и сильному снижению уровня α SMA на 47%, что было намного сильнее, чем эффект, наблюдаемый с каждым из этих средств отдельно (фиг. 12E). Синергизм в такой же степени присутствовал с использованием комбинации Тропифексора 3 мкМ и NTZ при 1,3 мкМ (фиг. 12F). Комбинация с Арамхолом при 3 мкМ и NTZ при 0,625 мкМ достигала 52% снижения уровня α SMA.

В отличие от этого, никакого синергизма не наблюдали с комбинацией NTZ с Налмефеном (JKB-121), ранее известным как налметрен, опиоидным антагонистом и антагонистом TLR-4, используемым преимущественно для лечения алкогольной зависимости, или PBI-4050, потенциальным лечением идиопатического пневмофиброза, острого легочного повреждения, кистозного фиброза, диабета.

В заключение, заявитель обнаружил неожиданные антифиброзные активности для комбинации соединения формулы (I) с конкретными ингибитором(ингибиторами) ROCK2, ингибитором(ингибиторами) ACC, двойными ингибиторами NOX1 и NOX4, ингибитором(ингибиторами) ASK1, конъюгатами жирных кислот с желчными кислотами (FABAC), агонистами FXR и антагонистами CCR.

Эти результаты показывают, что комбинация соединения формулы (I) или формулы (II) с ингибитором ROCK2, ингибитором ACC, двойным ингибитором NOX1 и NOX4, ингибитором ASK1, конъюгатом жирной кислоты с желчной кислотой, агонистом FXR и антагонистом CCR может быть синергетической и/или может иметь дополнительный эффект и также может обеспечивать терапевтическую пользу при различных типах фиброзных заболеваний.

Ссылочная литература

Broekhuysen, J., A. Stockis, et al. (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**(8): 387-394.

de Carvalho, L. P. S., C. M. Darby, et al. (2011). "Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*." *ACS Med. Chem. Lett.* **2**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 849-854.

Di Santo, N. and J. Ehrisman (2014). "A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug." *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **768**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 16-21.

Dubreuil, L., I. Houcke, et al. (1996). "In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms." *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2266-2270.

Finegold, S. M., D. Molitoris, et al. (2009). "Study of the in vitro activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora." *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 281-286.

Fox, L. M. and L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." *Clin. Infect. Dis.* **40**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1173-1180.

Hemphill, A., J. Mueller, et al. (2006). "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections." *Expert Opin. Pharmacother.* **7**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 953-964.

Hoffman, P. S., G. Sisson, et al. (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*." *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 868-876.

Megraudd, F., A. Occhialini, et al. (1998). "Nitazoxanide, a potential drug for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole." *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 2836-2840.

Pankuch, G. A. and P. C. Appelbaum (2006). "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species." *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1112-1117.

Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." *Antiviral Res.* **110**(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 94-103.

Rossignol, J. F. and R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S.P.R.L. Phavic, Belg. . 11 pp.

Rossignol, J. F. and H. Maisonneuve (1984). "Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections." *Am J Trop Med Hyg* **33**(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): 511-512.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENFIT

<120> ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

<130> B2428PC01

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> альфа-SMA прямой

<400> 1

ctgacagagg caccactgaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> альфа-SMA обратный

<400> 2

catctccaga gtccagcaca

20

<210> 3
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> Colla1 прямой

<400> 3
аггсгаасаа гgtгасагаг
20

<210> 4
<211> 19
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> Colla1 обратный

<400> 4
гссгагагаа ссагсагаг
19

<210> 5
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> Colla2 прямой

<400> 5
attgгагсс гaggтссгаг
20

<210> 6
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> Colla2 обратный

<400> 6
tttgссссга гgtatгссгаг
20

<210> 7
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> TGFb1 прямой

<400> 7
ttgcttcagc tccacagaga
20

<210> 8
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> TGFb1 обратный

<400> 8
tggttgtaga gggсааггас
20

<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> TIMP1 прямой

<400> 9
attсааггсг gtgggaaatg
20

<210> 10
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> TIMP1 обратный

<400> 10
ctcaagatac gccагггаас
20

<210> 11
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> TIMP2 прямой

<400> 11
gcatsaccса гаагаагагс
20

<210> 12
<211> 20
<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> TIMP2 обратный

<400> 12

gggtcctcga tgtcaagaaa
20

<210> 13

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> MMR2 прямой

<400> 13

tccстааgct catcgсаgас
20

<210> 14

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> MMR2 обратный

<400> 14

gcttссaaас ttcacgctct
20

<210> 15

<211> 20

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> MMR7 прямой

<400> 15

taattggctt cгсааgгага
20

<210> 16

<211> 22

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> MMR7 обратный

<400> 16

aaggcatgас стагаgtgtt сс
22

<210> 17
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CCR2 прямой

 <400> 17
 taatatgtta cctcagttca tccacgg
 27

<210> 18
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CCR2 обратный

 <400> 18
 tgctcttcag ctttttacag cctatc
 26

<210> 19
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CCR5 прямой

 <400> 19
 attctccaca ccctgtttcg
 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CCR5 обратный

 <400> 20
 gaattcctgg aagtggtca
 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>

<223> GAPDH прямой
 <400> 21
 tatgactcca ctсacggсаа
 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> искусственная

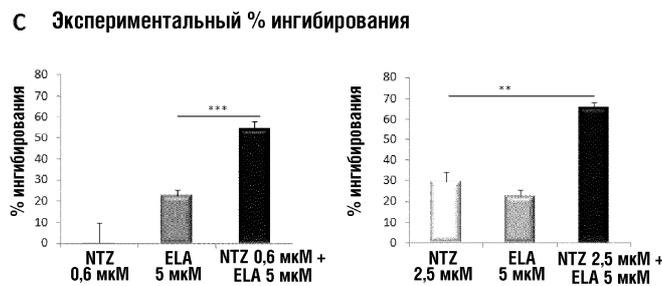
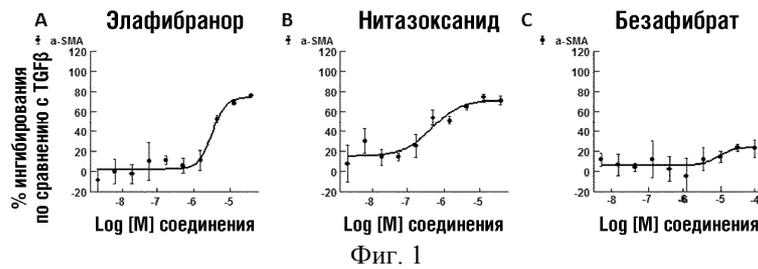
<220>
 <223> GAPDH обратный

<400> 22
 tссacgacat actсagсacc
 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

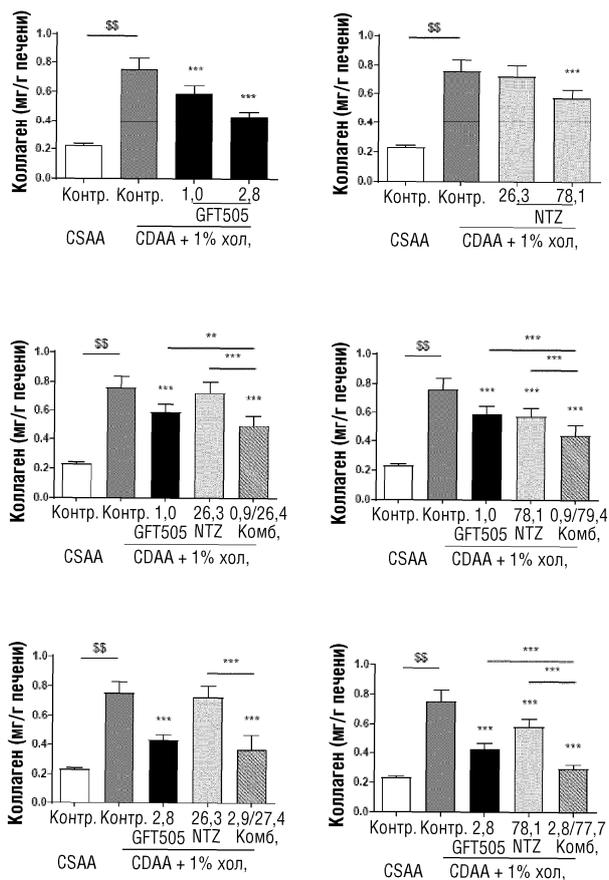
1. Фармацевтический комбинированный продукт, включающий:
 компонент (i), выбранный из нитазоксанида, тизоксанида, [(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d3) этаноата, 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d2) этаноата; или 2-[(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)карбамоил]фенил (d1) этаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-нитротиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3,3-диметилбутаноата, 2-(5-хлортиазол-2-илкарбамоил)фенил 2-амино-3-метилпентаноата; или из фармацевтической соли вышеуказанного соединения; и
 компонент (ii), где компонент (ii) представляет собой GS-0976, GS-4997 (Селонсертиб), GKT-831 (ранее называемый GKT137831), KD-025, Ценикривирок (CVC), Арамхол и Тропифексор (LJN-452) или фармацевтически приемлемую соль вышеуказанного соединения.
2. Фармацевтический комбинированный продукт по п.1, где комбинированный продукт представляет собой композицию, включающую компоненты (i) и (ii) и фармацевтически приемлемый носитель.
3. Фармацевтический комбинированный продукт по п.1 или 2, где комбинированный продукт представляет собой набор из частей, включающий компоненты (i) и (ii), для последовательного, раздельного или одновременного использования.
4. Фармацевтический комбинированный продукт по любому из пп.1-3, где компоненты (i) и (ii) сформулированы в виде инъекционной суспензии, геля, масла, пилюли, таблетки, суппозитория, порошка, капсулы, аэрозоля, мази, крема, пластыря или в виде галеновых форм для пролонгированного и/или медленного высвобождения.
5. Применение фармацевтического комбинированного продукта по любому из пп.1-4 в качестве лекарственного средства.
6. Применение фармацевтического комбинированного продукта по любому из пп.1-4 для лечения фиброзного заболевания.
7. Применение по п.6, где фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза печени, почки, кожи, эпидермиса, эндодермы, мышцы, сухожилия, хряща, сердца, поджелудочной железы, легкого, матки, нервной системы, мужских половых желез, полового члена, яичника, надпочечника, артерии, вены, толстой кишки, кишечника, тонкого кишечника, желчных путей, мягкой ткани, средостения или ретроперитонеального пространства, костного мозга, сустава и желудка, в частности из фиброза печени, кишки, легкого, сердца, почки, мышцы, кожи, мягкой ткани, костного мозга, кишечника, глаза и сустава.
8. Применение фармацевтического комбинированного продукта по любому из пп.1-4 для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из метаболических заболеваний печени, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), лекарственно-индуцированных заболеваний печени, алкогольных болезней печени, инфекционных заболеваний печени, воспалительных заболеваний печени, опосредованных дисфункцией иммунной системы заболеваний печени, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний, рестеноза, синдрома Х, метаболического синдрома, диабета, ожирения, гипертензии, хронических холангиопатий, таких как первичный склерозирующий холангит (PSC), первичный билиарный холангит (PBC), билиарная атрезия, семейный внутрипеченочный холестаза типа 3 (PFIC3), воспалительных заболеваний кишечника, болезни Крона, язвенного колита, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, желудочно-кишечного рака, гастрального рака, колоректального рака, индуцированного метаболическим заболеванием фиброза или цирроза печени,

NAFLD-индуцированного фиброза или цирроза, NASH-индуцированного фиброза или цирроза, вызванного алкоголем фиброза или цирроза печени, лекарственно-индуцированного фиброза или цирроза печени, инфекционно-индуцированного фиброза или цирроза печени, индуцированного паразитарной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного бактериальной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного вирусной инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного HCV- и ВИЧ-инфекцией фиброза или цирроза печени, индуцированного лучевой или химиотерапией фиброза или цирроза, фиброза желчных путей, фиброза или цирроза печени в результате любого хронического холестатического заболевания, фиброза кишечника любой этиологии, индуцированного болезнью Крона фиброза, индуцированного язвенным колитом фиброза, фиброза кишечника фиброза тонкого кишечника, фиброза толстой кишки, фиброза желудка, фиброза легкого, фиброза легкого, являющегося следствием хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как ХОБЛ, астма, эмфизема, легкие курильщика, туберкулез, пневмофиброза, идиопатического пневмофиброза (IPF).



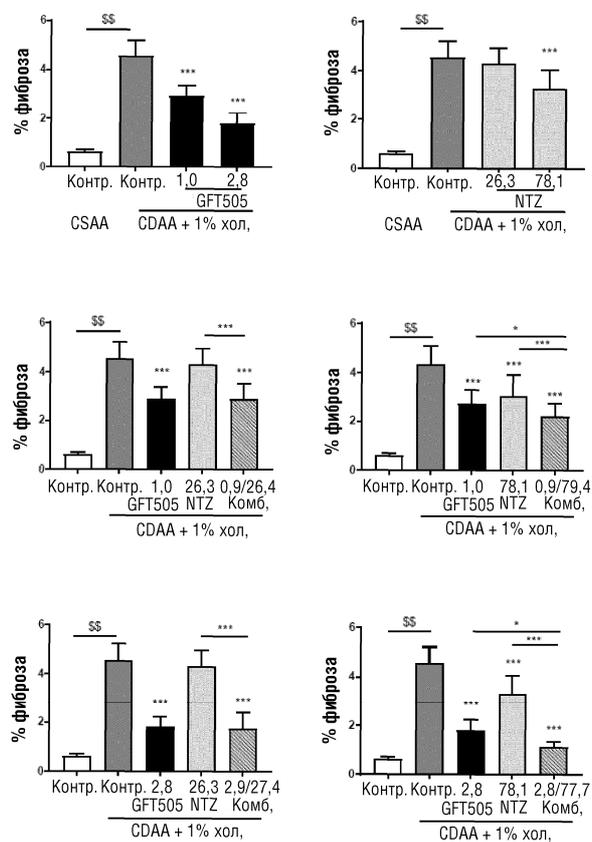
Фиг. 2

Печеночный коллаген



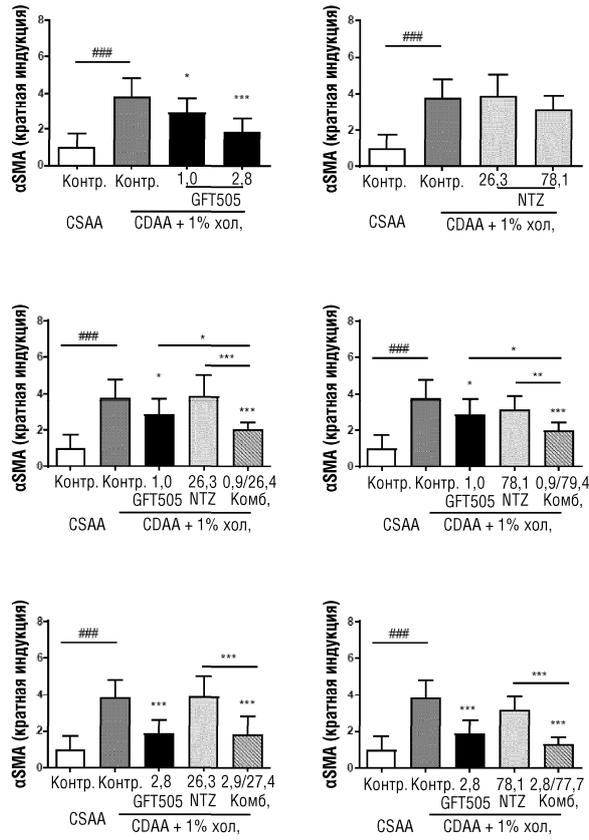
Фиг. 3

Гистология



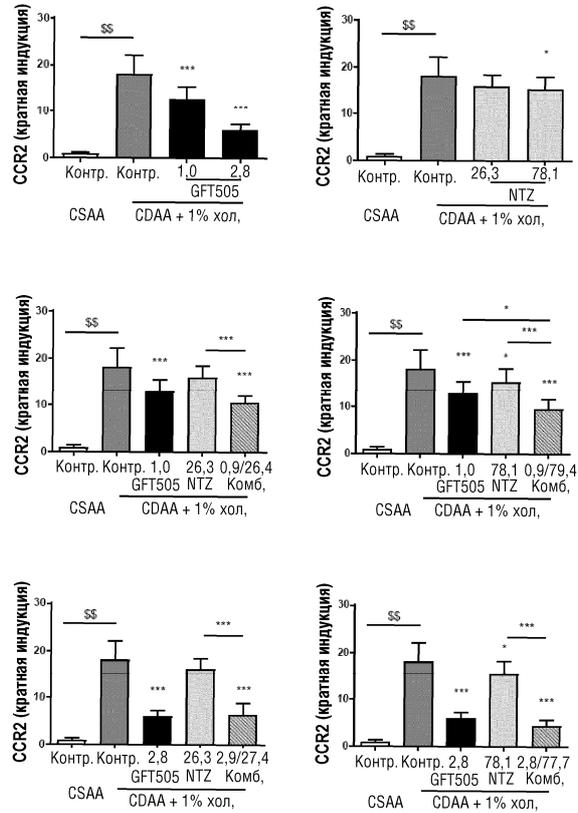
Фиг. 4

Экспрессия гена α SMA в печени



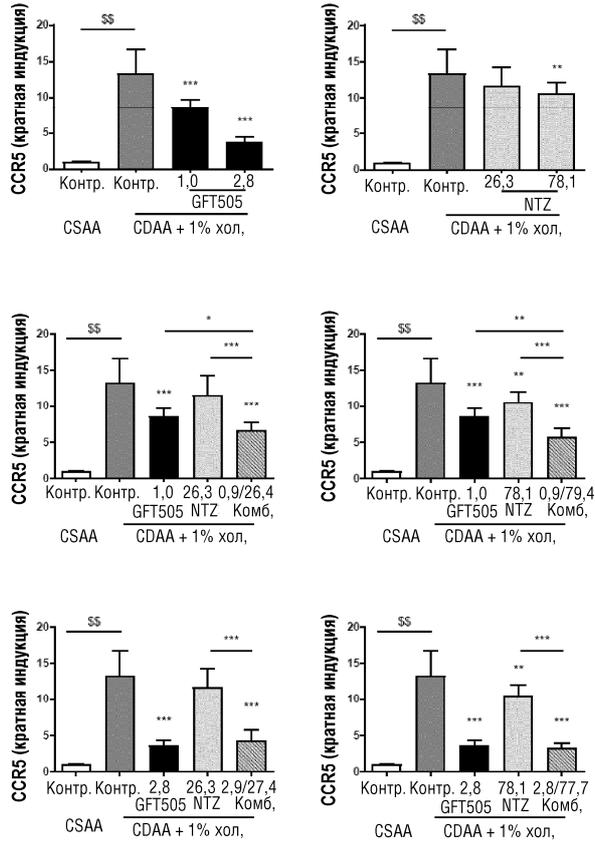
Фиг. 5

Экспрессия гена CCR2 в печени



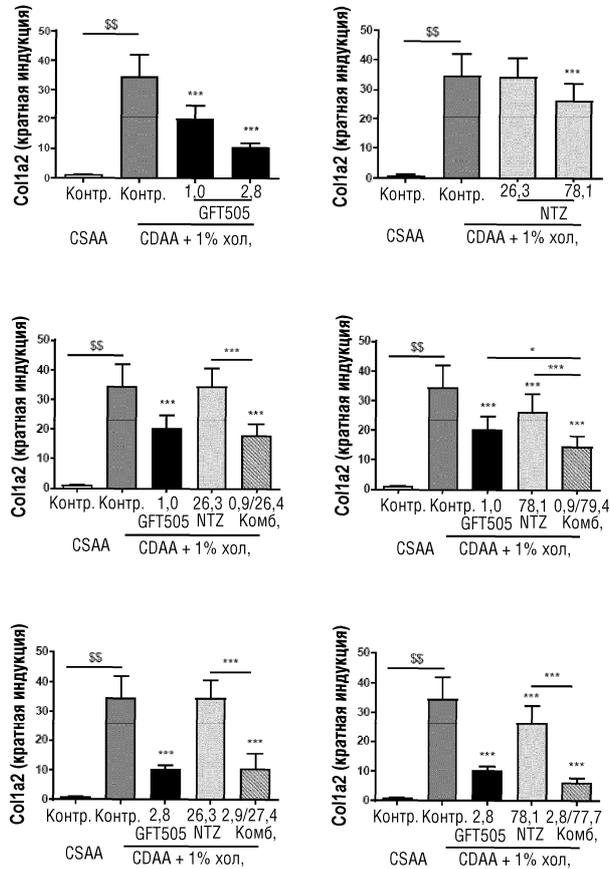
Фиг. 6

Экспрессия гена CCR5 в печени



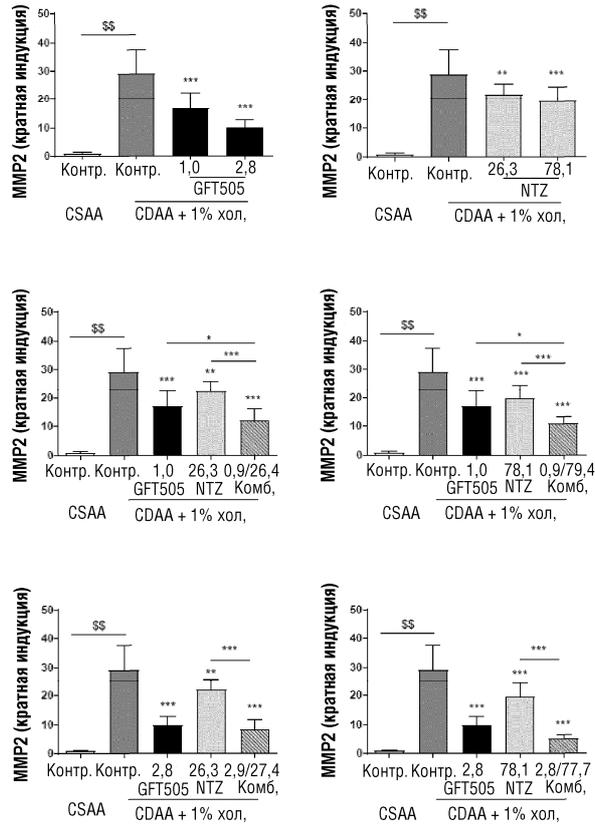
Фиг. 7

Экспрессия гена Col1a2 в печени



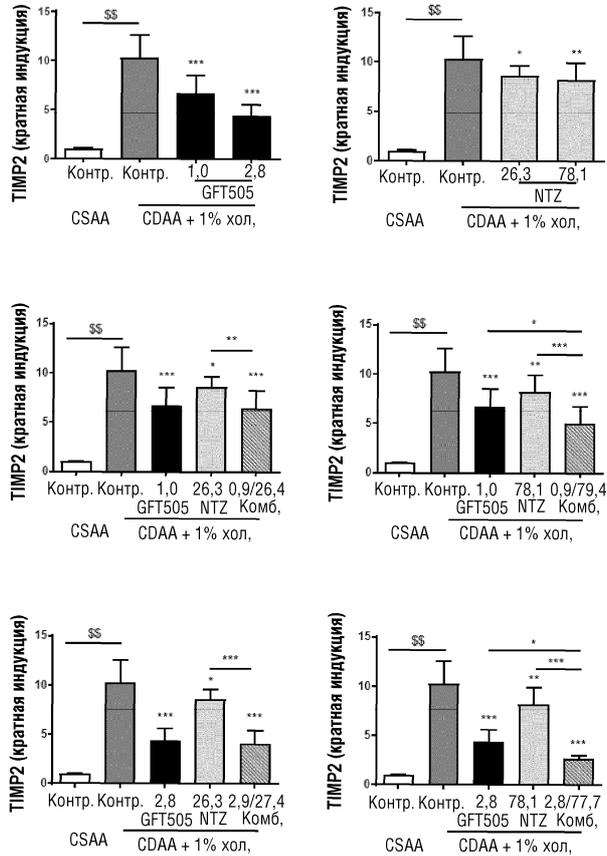
Фиг. 8

Экспрессия гена MMP2 в печени



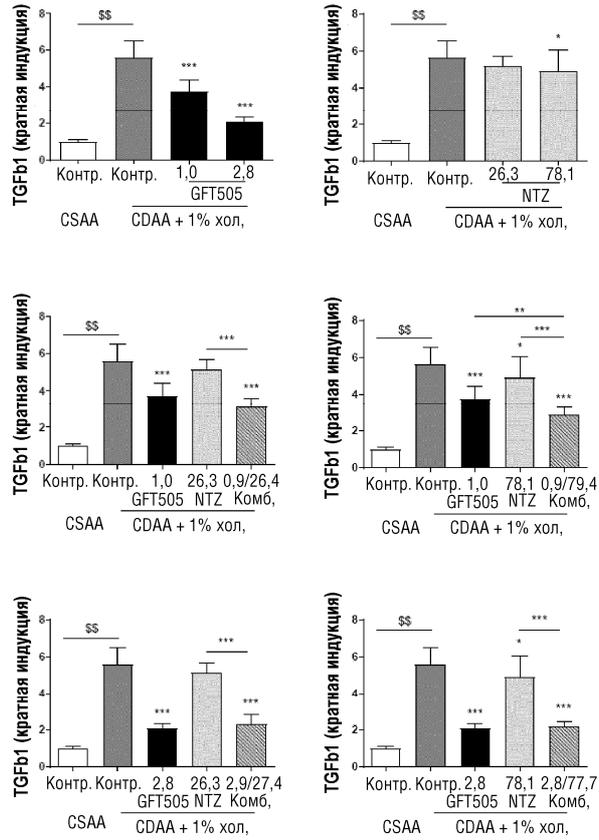
Фиг. 9

Экспрессия гена TIMP2 в печени

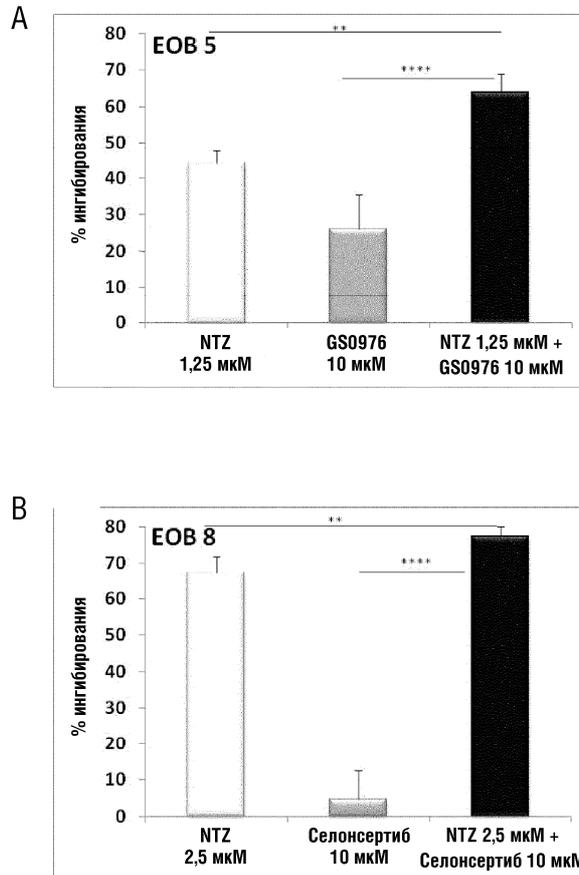


Фиг. 10

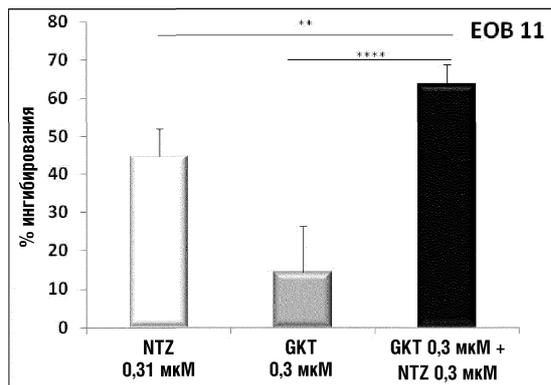
Экспрессия гена TGFβ1 в печени



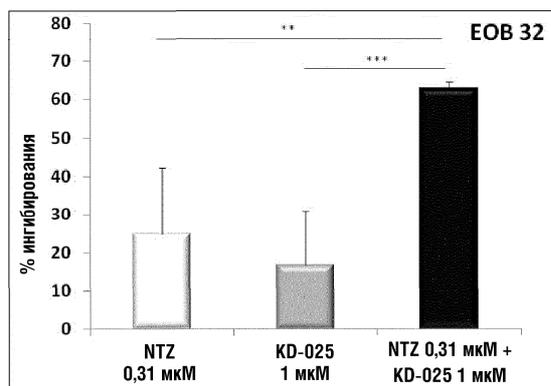
Фиг. 11



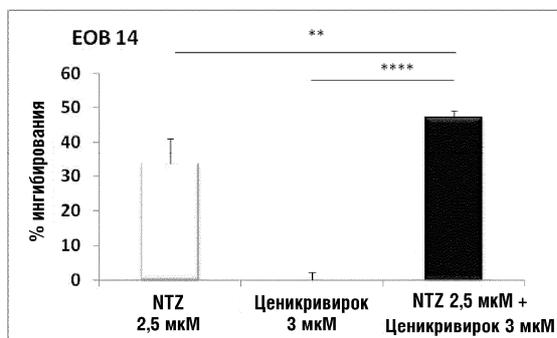
C



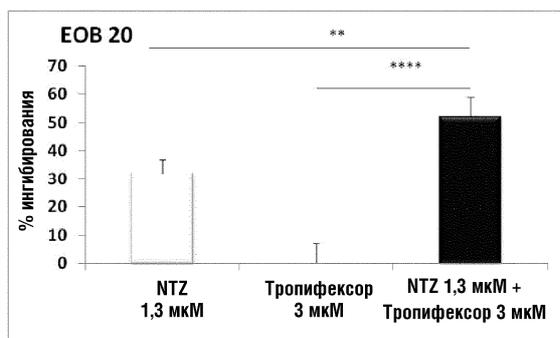
D



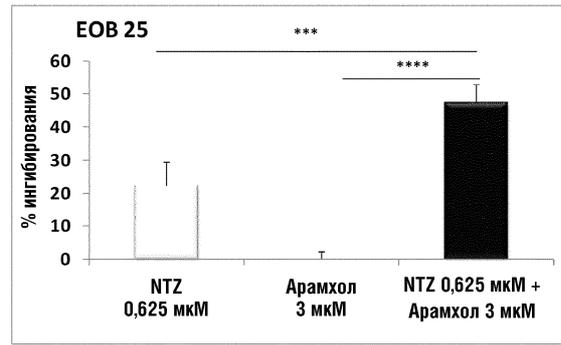
E



F



G



Фиг. 12

