

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036404**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.06

(51) Int. Cl. *A61K 31/216* (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791770

(22) Дата подачи заявки
2016.02.05

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

(31) **62/113,134**

(72) Изобретатель:

(32) **2015.02.06**

**Прузански Марк (US), Адорини
Лучано (IT)**

(33) **US**

(43) **2017.12.29**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2016/016694**

Медведев В.Н. (RU)

(87) **WO 2016/127019 2016.08.11**

(56) US-A1-20090105343

**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНТЕРСЕПТ ФАРМАСЮТИКАЛ,
ИНК. (US)**

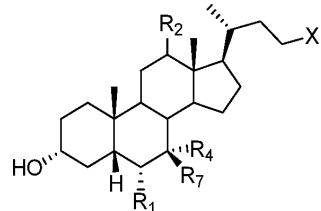
US-A1-20070203155

US-A1-20060252670

US-A1-20140371190

US-A1-20080096921

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного фарнезоидным X-рецептором (FXR), или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями липидов, снижения уровня фермента печени, или ингибиования, или обеспечения регрессии фиброза, содержащая терапевтически эффективные количества агониста FXR, безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой соединение формулы A:



(A) ,

или его фармацевтически приемлемую соль, или конъюгат с глицином или таурином, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил; R₂ представляет собой водород или α-гидроксил; X представляет собой C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H или OSO₃H; R₄ представляет собой гидроксил или водород; R₇ представляет собой гидроксил или водород; m равно 1, 2 или 3; и n равно 1, 2 или 3. Изобретение также относится к способу ингибиования или обеспечения регрессии фиброза, включающему введение указанной фармацевтической композиции субъекту. Изобретение обеспечивает улучшенную терапию для лечения состояний, характеризующихся повышенными концентрациями циркулирующих в крови липидных соединений, таких как холестерин и триглицериды.

036404

B1

B1

036404

Предпосылки изобретения

Ряд состояний сопровождается повышенными концентрациями циркулирующих в крови липидных соединений, таких как холестерин и триглицериды. Такие состояния включают сахарный диабет II типа, первичный билиарный цирроз (PBC), первичный склерозирующий холангит (PSC), различные хронические гепатитные состояния (гепатит В и С), NASH (неалкогольный стеатогепатит) и артериальные заболевания, в том числе заболевание коронарных артерий, цереброваскулярное заболевание артерий, заболевание периферических сосудов, формы аневризмы аорты и состояния атеросклеротического поражения сонной артерии. Ранее для лечения и предупреждения сосудистых явлений (таких как сердечная недостаточность, эмболия, сердечные приступы и инсульты), которыми сопровождаются гиперлипидемические состояния, применялись различные методики понижения уровня липидов. Такие виды лечения включали изменения режима питания и контроль высоких уровней триглицеридов и холестерина, циркулирующих в крови. Лечение последнего осуществляли, как правило, фармакологически, а позднее с использованием различных "статинов". Терапевтические средства, применяемые для лечения состояний, связанных с повышенными уровнями липидов, включают различные производные фиброевой кислоты. Некоторые более ранние производные фиброевой кислоты, в том числе клофибррат, непродолжительное время использовались для лечения состояний, ассоциированных с повышенными уровнями липидов, но в последнее время в число средств противолипидной терапии вошли новые фибрараты, в том числе фенофибррат, гемифиброзил, ципрофибррат, а совсем недавно - фибрараты, содержащие пиперидин, 4-гидроксипиперидин, пиперидин-3-ен и пиперазин. Эти более новые молекулы обладают перспективными свойствами в отношении снижения как уровня холестерина, так и уровня триглицеридов. Однако в некоторых случаях производное фиброевой кислоты в отдельности является непригодным для контроля тяжелой степени гиперлипидемии, присутствующей у многих пациентов. Профиль побочных эффектов производного фиброевой кислоты также может быть улучшен в результате снижения дозы, как, например, в условиях комбинированной терапии.

Соответственно существует потребность в улучшенной терапии для лечения состояний, характеризующихся повышенными концентрациями циркулирующих в крови липидных соединений, таких как холестерин и триглицериды.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой иллюстративную микрофотографию среза печени, окрашенного сириусом красным, мышей с имитацией BDL.

Фиг. 1В представляет собой иллюстративную микрофотографию среза печени, окрашенного сириусом красным, мышей с BDL, обработанных средой.

Фиг. 1С представляет собой иллюстративную микрофотографию среза печени, окрашенного сириусом красным, мышей с BDL, обработанных ОСА.

Фиг. 1Д представляет собой иллюстративную микрофотографию среза печени, окрашенного сириусом красным, мышей с BDL, обработанных аторвастатином.

Фиг. 1Е представляет собой иллюстративную микрофотографию среза печени, окрашенного сириусом красным, мышей с BDL, обработанных ОСА и аторвастатином.

Фиг. 2 представляет собой гистограмму, на которой показана область, положительная по сириусу красному (%), у мышей с BDL, обработанных ОСА и аторвастатином в отдельности и в комбинации.

Фиг. 3А представляет собой гистограмму, на которой показано количество очагов с воспалительными клетками после обработки ОСА и низкодозовым фенофибрратом в отдельности и в комбинации у мышей APOE*3Leiden.CETP.

Фиг. 3В представляет собой гистограмму, на которой показано количество очагов с воспалительными клетками после обработки ОСА и высокодозовым фенофибрратом в отдельности и в комбинации у мышей APOE*3Leiden.CETP.

Фиг. 4 представляет собой гистограмму, на которой показаны эффекты ОСА и аторвастатина в отдельности и в комбинации в отношении стадии фиброза у мышей с генотипом ob/ob по лептину.

Фиг. 5А представляет собой гистограмму, на которой показаны уровни триглицеридов в плазме крови у мышей с генотипом ob/ob по лептину, обработанных ОСА и аторвастатином в отдельности и в комбинации.

Фиг. 5В представляет собой гистограмму, на которой показано изменение уровней триглицеридов в плазме крови по сравнению с исходным уровнем у мышей с генотипом ob/ob по лептину, обработанных ОСА и аторвастатином в отдельности и в комбинации.

Фиг. 6А представляет собой гистограмму, на которой показан анализ представленности канонических метаболических путей у мышей на комбинации HFC+ОСА в сравнении с мышами APOE*3Leiden.CETP, выдерживаемыми на HFC.

Фиг. 6В представляет собой гистограмму, на которой показан анализ представленности канонических метаболических путей у мышей на комбинации HFC+ОСА+низкодозовый фенофибррат в сравнении с мышами APOE*3Leiden.CETP, выдерживаемыми на HFC.

Фиг. 7А представляет собой диаграмму Венна, на которой показано количество новых дифференциально экспрессируемых генов, регулируемых комбинацией ОСА+низкодозовый фенофибррат, в срав-

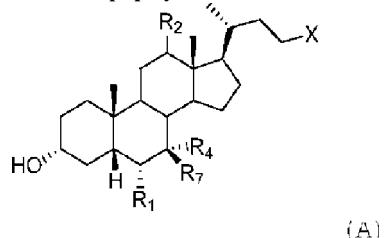
нении с монотерапией у мышей APOE*3Leiden.CETP.

Фиг. 7В представляет собой гистограмму, на которой показана представленность в метаболических путях генов, регулируемых комбинацией ОСА+низкодозовый фенофибрат, в сравнении с монотерапией у мышей APOE*3Leiden.CETP.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором показан эффект ОСА и комбинации статина (статинов) в отношении уровня холестерина LDL у людей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного фарнезоидным X-рецептором (FXR), или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями липидов, снижения уровня фермента печени или ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, содержащей терапевтически эффективные количества агониста FXR, безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой соединение формулы А:



(A)

или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с глицином или таурином, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил;

R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

X представляет собой C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H или OSO₃H;

R₄ представляет собой гидроксил или водород;

R₇ представляет собой гидроксил или водород;

m равно 1, 2 или 3; и

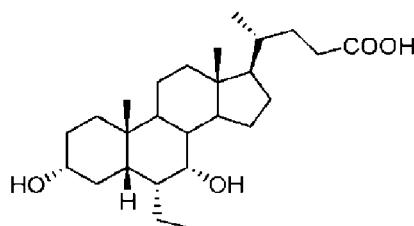
n равно 1, 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил. В дополнительных вариантах R₁ представляет собой метил, этил или пропил. В дополнительных вариантах R₁ представляет собой этил.

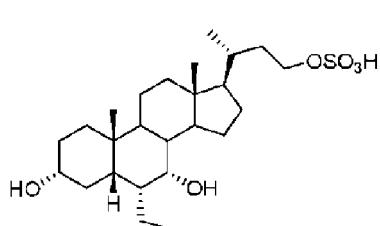
В некоторых вариантах осуществления изобретения X выбран из C(O)OH, C(O)NH(CH₂)SO₃H, C(O)NH(CH₂)CO₂H, C(O)NH(CH₂)₂SO₃H и C(O)NH(CH₂)₂CO₂H. В дополнительных вариантах X представляет собой C(O)OH. В других вариантах X представляет собой OSO₃H.

В некоторых вариантах R₄ представляет собой гидроксил и R₇ представляет собой водород.

В некоторых вариантах агонист FXR представляет собой

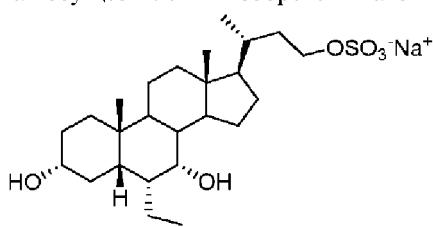


(1) или

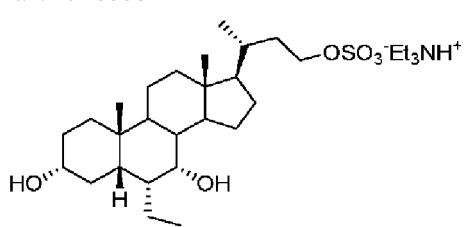


(2)

или их фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с глицином или таурином. В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист FXR представляет собой

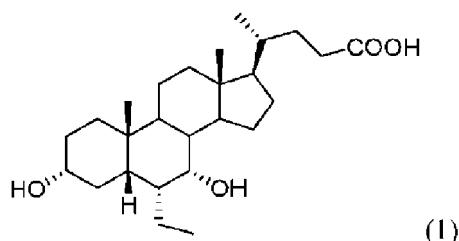


(3) или



(4)

В некоторых вариантах агонист FXR представляет собой



В некоторых вариантах фармацевтическая композиция может также содержать по меньшей мере один статин. В некоторых вариантах статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастатина, мевастатина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастина, дигидрокомпактина и компактина.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного FXR, или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями циркулирующих липидов в крови, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

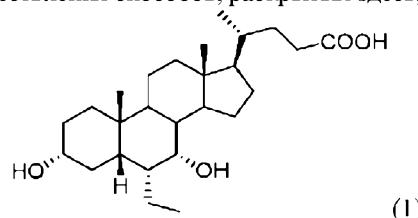
В некоторых вариантах заболевание или состояние выбрано из первичного билиарного цирроза (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), портальной гипертензии, хологенной диареи, хронической печеночной недостаточности, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), инфицирования гепатитом С, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброза печени, сердечно-сосудистого заболевания и гиперлипидемии.

В некоторых вариантах состояние выбрано из резистентного первичного билиарного цирроза; первичного билиарного цирроза, с которым ассоциированы повышение показателей функциональных проб печени и гиперлипидемия; первичного склерозирующего холангита; стеатогепатита, не индуцированного алкоголем; хронической печеночной недостаточности, ассоциированной с гепатитом В, С или употреблением алкоголя; гиперлипидемии, где гиперлипидемия представляет собой первичную гиперлипидемию с генетической составляющей или без нее; и гиперлипидемии, ассоциированной с заболеванием коронарных артерий, цереброваскулярным заболеванием артерий, заболеванием периферических сосудов, формами аневризмы аорты или атеросклерозом сонной артерии.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного FXR, или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями циркулирующих липидов в крови, снижения уровня фермента печени или ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах фиброз выбран из фиброза печени, фиброза почки и фиброза кишечника.

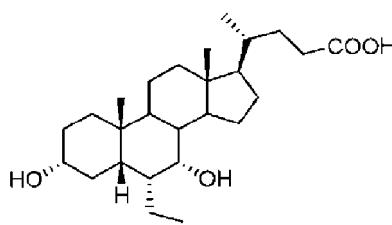
В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых здесь, агонист FXR представляет собой



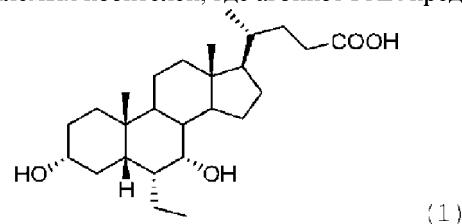
В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытое здесь, заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой первичный билиарный цирроз (PBC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытое здесь, заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения первичного билиарного цирроза (PBC), включающим введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безафибата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой



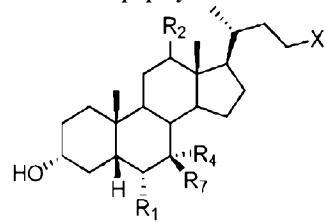
Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающим введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой



Композиции и способы согласно настоящему изобретению направлены на нереализованные потребности в лечении или предупреждении заболевания или нарушения, характеризующегося повышенными концентрациями циркулирующих в крови липидных соединений, таких как холестерин и триглицериды.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного фарнезоидным X-рецептором (FXR), или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями липидов, снижения уровня фермента печени или ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, содержащей терапевтически эффективные количества агониста FXR, безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой соединение формулы А:



или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с глицином или таурином, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил;

R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

X представляет собой C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H или OSO₃H;

R₄ представляет собой гидроксил или водород;

R₇ представляет собой гидроксил или водород;

m равно 1, 2 или 3; и

n равно 1, 2 или 3.

В некоторых вариантах R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил. В дополнительных вариантах R₁ представляет собой метил, этил или пропил. В дополнительных вариантах R₁ представляет собой этил.

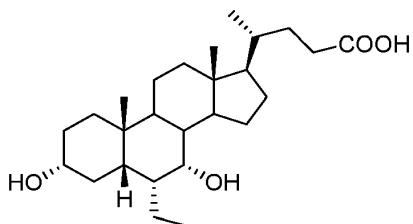
В некоторых вариантах X выбран из C(O)OH, C(O)NH(CH₂)₂SO₃H, C(O)NH(CH₂)₂CO₂H, C(O)NH(CH₂)₂SO₃H и C(O)NH(CH₂)₂CO₂H.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения X представляет собой C(O)OH.

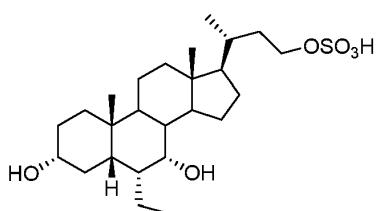
В других вариантах осуществления изобретения X представляет собой OSO₃H.

В некоторых вариантах R₄ представляет собой гидроксил и R₇ представляет собой водород.

В некоторых вариантах агонист FXR представляет собой

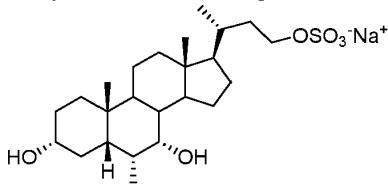


(1) или

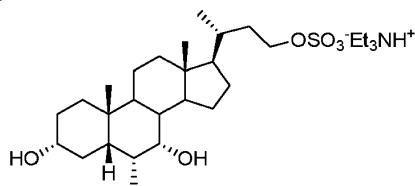


(2)

или их фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с глицином или таурином. В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист FXR представляет собой

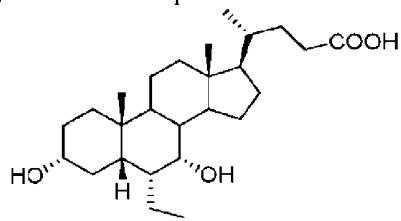


(3) или



(4).

В некоторых вариантах осуществления изобретения агонист FXR представляет собой



(1)

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может также содержать по меньшей мере один статин. В некоторых вариантах статин выбран из симвастатина, флувастатина, правастатина, риваститина, мевастатина, аторвастатина, церивастатина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного FXR, или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями циркулирующих липидов в крови, снижения уровня фермента печени или ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

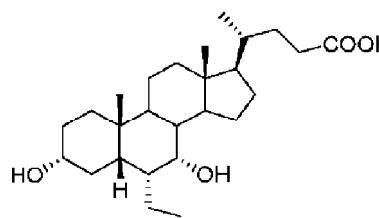
В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние выбрано из первичного билиарного цирроза (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), порталной гипертензии, хологенной диареи, хронической печеночной недостаточности, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), инфицирования гепатитом С, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброза печени, сердечно-сосудистого заболевания и гиперлипидемии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения состояние выбрано из резистентного первичного билиарного цирроза; первичного билиарного цирроза, с которым ассоциированы повышение показателей функциональных проб печени и гиперлипидемия; первичного склерозирующего холангита; стеатогепатита, не индуцированного алкоголем; хронической печеночной недостаточности, ассоциированной с гепатитом В, С или употреблением алкоголя; гиперлипидемии, где гиперлипидемия представляет собой первичную гиперлипидемию с генетической составляющей или без нее; и гиперлипидемии, ассоциированной с заболеванием коронарных артерий, цереброваскулярным заболеванием артерий, заболеванием периферических сосудов, формами аневризмы аорты или атеросклерозом сонной артерии.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного FXR, или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями циркулирующих липидов в крови, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающим введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения фиброз выбран из фиброза печени, фиброза почки и фиброза кишечника.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых здесь, агонист FXR представляет собой

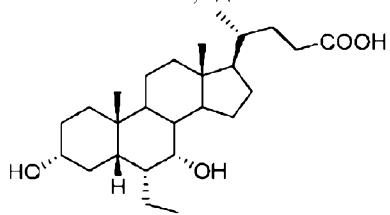


(1)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытое здесь, заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой первичный билиарный цирроз (PBC).

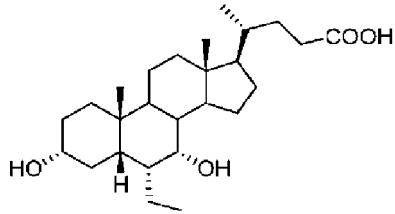
В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытое здесь, заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения первичного билиарного цирроза (PBC), включающим введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безфибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой



(1)

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающим введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безфибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой



(1)

Настоящая заявка также описывает фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере один агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта и/или двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-альфа. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-дельта. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и дельта. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и гамма. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-альфа и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-альфа и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта и по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и дельта. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма. В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один агонист PPAR-альфа, по меньшей мере один агонист PPAR-дельта и по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и дельта. В одном примере агонист PPAR-альфа представляет собой фибрат, такой как фибраты, описанные в данном документе. В одном примере агонист PPAR-дельта представляет собой {4-[({4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3-тиазол-5-ил}метил)сульфанил]-2-метилфенокси}уксусную кислоту (также известную как GW501516, GW1516 и "эндуробол"), {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2H-[1,2,3]тиазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту, [4-[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазоллил]метил]тио]-2-метилфенокси}уксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту (также известную как GFT505). В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и гамма представляет собой алеглитазар ((2S)-2-метокси-3-[4-[2-(5-метил-2-фенил-4-оксазолил)этокси]-7-бензотиофенил]пропановую кислоту), мураглитазар (N-[{(4-метоксифенокси)карбонил]-N-{4-[2-(5-метил-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил)этокси]бензил}глицин), тезаглитазар ((2S)-2-этокси-3-[4-[2-(4-метилсульфонилоксифенил)этокси]фе-

нил]пропановую кислоту) или сароглитазар ((2S)-2-этокси-3-[4-(2-метил-5-[4-(метилсульфанил)фенил]-1Н-пиррол-1-ил)этокси]фенил]пропановую кислоту) или их фармацевтически приемлемую соль. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

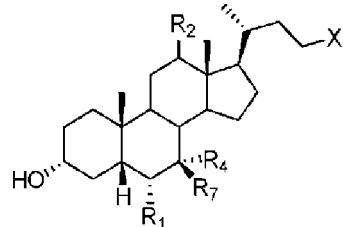
Настоящая заявка также описывает фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере один фибрат и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR. Агонист FXR может представлять собой любой агонист FXR. Фибрат может представлять собой любой фибрат. В одном примере фибрат выбран из любого из фибраторов, описанных в данном документе.

Настоящая заявка также описывает фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере одно гиполипидемическое средство и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR. Агонист FXR может представлять собой любой агонист FXR. Гиполипидемическое средство может представлять собой любое гиполипидемическое средство. В одном примере гиполипидемическое средство выбрано из любого из гиполипидемических средств, описанных в данном документе.

Настоящая заявка также описывает фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере один статин и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR. Агонист FXR может представлять собой любой агонист FXR. Статин может представлять собой любой статин. В одном примере статин выбран из любого из статинов, описанных в данном документе.

Настоящая заявка также описывает фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере один агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта и/или двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма, по меньшей мере одно гиполипидемическое средство и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR. Настоящая заявка также направлена на фармацевтическую композицию, содержащую первое соединение, по меньшей мере один агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта и/или двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма, по меньшей мере один статин и необязательно один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где первое соединение является агонистом FXR. В одном примере агонист PPAR-альфа представляет собой фибрат, такой как фибраторы, описанные в данном документе. В одном примере агонист PPAR-дельта представляет собой {4-[{4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3-тиазол-5-ил}метил]сульфанил}-2-метилфенокси}уксусную кислоту, {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2Н-[1,2,3]тиазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту, [4-[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метил]тио]-2-метилфенокси}уксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и гамма представляет собой алеглитазар, мураглитазар, тезаглитазар, сароглитазар или их фармацевтически приемлемую соль. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль. В одном примере гиполипидемическое средство выбрано из любого из гиполипидемических средств, описанных в данном документе. В одном примере статин выбран из любого из статинов, описанных в данном документе.

В одном примере первое соединение фармацевтической композиции представляет собой соединение формулы A:



(A)

или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, где

R₁ представляет собой водород или незамещенный C₁-C₆-алкил;

R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

X представляет собой C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H или OSO₃H;

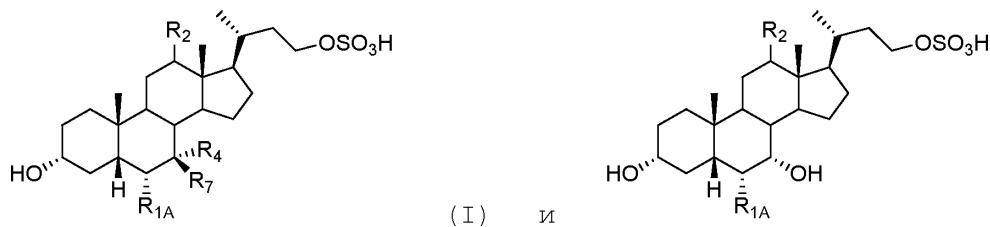
R₄ представляет собой гидроксил или водород;

R₇ представляет собой гидроксил или водород;

m равняется 1, 2 или 3; и

n равняется 1, 2 или 3.

В дополнительном примере первое соединение фармацевтической композиции выбрано из формул I и IA:



(IIA),

или их фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой, где

R_{1A} представляет собой водород или незамещенный C₁-C₆-алкил;

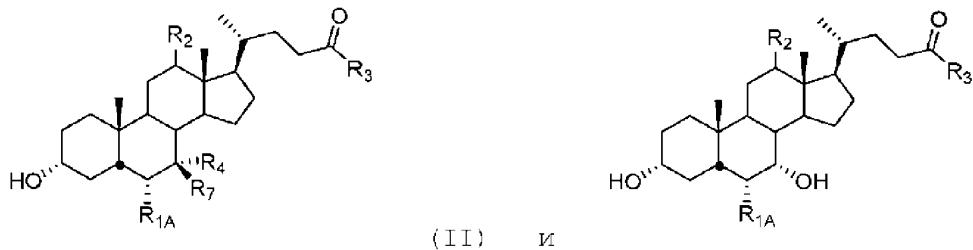
R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

R₄ представляет собой гидроксил или водород; и

R₇ представляет собой гидроксил или водород.

В одном аспекте первое соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления первое соединение представляет собой натриевую соль формулы I или IA. В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой аммонийную соль соединения формулы I или IA. В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой триэтиламмонийную соль соединения формулы I или IA.

В еще одном примере первое соединение фармацевтической композиции выбрано из формул II и IIA:



(IIIA),

или их фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой, где

R_{1A} представляет собой водород или незамещенный C₁-C₆-алкил;

R₂ представляет собой водород или α-гидроксил;

R₃ представляет собой гидроксил, NH(CH₂)_mSO₃H или NH(CH₂)_nCO₂H;

R₄ представляет собой гидроксил или водород;

R₇ представляет собой гидроксил или водород;

m равняется 1, 2 или 3; и

n равняется 1, 2 или 3.

В одном примере композиция содержит первое соединение формулы A, I, IA, II или IIA, где R₂ представляет собой водород.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы A, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где R₁ представляет собой незамещенный C₁-C₃-алкил. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где R₁ выбран из метила, этила и пропила. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где R₁ представляет собой этил.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы I, IA, II или IIA, где R_{1A} представляет собой незамещенный C₁-C₆-алкил. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы I, IA, II или IIA, где R_{1A} представляет собой незамещенный C₁-C₃-алкил. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы I, IA, II или IIA, где R_{1A} выбран из метила, этила и пропила. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы I, IA, II или IIA, где R_{1A} представляет собой этил.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы A, где X выбран из C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H и C(O)NH(CH₂)_nCO₂H. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где X выбран из C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H, C(O)NH(CH₂)₂SO₃H, C(O)NH(CH₂)₂CO₂H. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где X представляет собой C(O)OH. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где X представляет собой OSO₃H. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где первое соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль. Фармацевтически приемлемая соль может представлять собой любую соль. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы A, где X представляет собой OSO₃⁻Na⁺. В одном аспекте компози-

ция содержит первое соединение формулы А, где X представляет собой $\text{OSO}_3^-\text{NHEt}_3^+$. В одном аспекте коньюгат с аминокислотой представляет собой коньюгат с глицином. В одном аспекте коньюгат с аминокислотой представляет собой коньюгат с таурином.

В еще одном примере композиция содержит первое соединение формулы II или IIА, где R₃ выбран из OH, NH(CH₂)SO₃H, NH(CH₂)CO₂H, NH(CH₂)₂SO₃H и NH(CH₂)₂CO₂H. В одном аспекте композиция содержит первое соединение формулы II или IIА, где R₃ представляет собой OH.

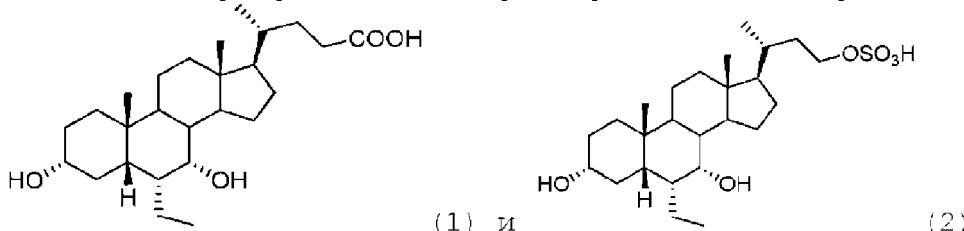
В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы A, I или II, где R₄ представляет собой гидроксил и R₇ представляет собой водород.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы A, где R₁ выбран из метила, этила и пропила, R₄ представляет собой OH, R₇ представляет собой H и R₂ представляет собой H.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы I или II, где R_{1A} выбран из метила, этила и пропила, R₄ представляет собой OH, R₇ представляет собой H и R₂ представляет собой H.

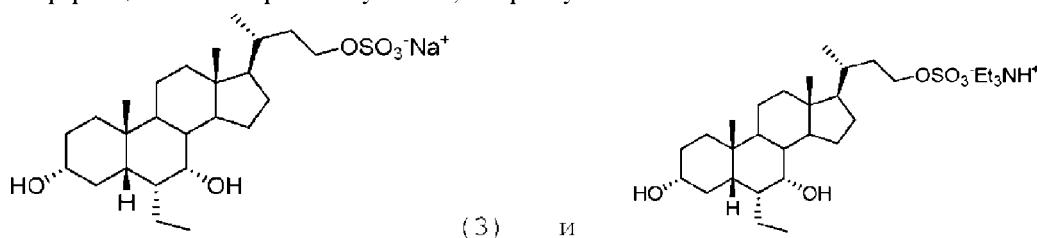
В дополнительном примере композиция содержит первое соединение формулы IA или IIА, где R_{1A} выбран из метила, этила и пропила и R₂ представляет собой H.

В дополнительном примере композиция содержит первое соединение, выбранное из



или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В еще одном дополнительном примере композиция содержит первое соединение, которое представляет собой фармацевтически приемлемую соль, выбранную из



(4).

Соединения формул I, IA, II и IIА представляют собой подклассы соединений формулы А. Признаки, описанные в данном документе для соединений формулы А, равным образом применимы к соединениям формул I, IA, II и IIА. В настоящей заявке также описаны фармацевтические композиции, упаковки или наборы и пути терапевтического применения комбинации.

Одной из задач, решаемых с помощью настоящего изобретения, является идентификация средств комбинированной терапии для лечения или предупреждения состояний, связанных с повышенными концентрациями циркулирующих в крови липидных соединений, таких как холестерин и триглицериды, например холестатического состояния печени, такого как РВС, а также для снижения уровня циркулирующих в крови липидных соединений (например, холестерина, LDL и триглицеридов) и для снижения уровня билирубина и/или ферментов печени, таких как щелочная фосфатаза (ALP, AP или Alk Phos), аланинаминотрансфераза (ALT), аспартатаминотрансфераза (AST), гамма-глутамилтранспептидаза (GGT), лактатдегидрогеназа (LDH) и 5'-нуклеотидаза. Хотя лекарственные средства от состояний, связанных с повышенными уровнями липидов и/или уровнями ферментов печени, являются доступными, эти лекарственные средства часто не подходят для многих пациентов по множеству причин. Например, определенные лекарственные средства являются неэффективными для пациентов, у которых развилась устойчивость к лекарственному средству, например, к урсодезоксихолевой кислоте. В качестве другого примера, многие лекарственные средства на основе статинов оказывают нежелательные эффекты, такие как проблемы с мышцами, потеря когнитивных способностей, нейропатия, дисфункция поджелудочной железы и печени и нарушение половой функции. Некоторые лекарственные средства могут быть непригодными для лечения в случае введения в отдельности. Например, в некоторых случаях одно гиполипидемическое средство в отдельности является непригодным для контроля тяжелой степени гиперлипидемии, присутствующей у многих пациентов. Для некоторых лекарственных средств может требоваться введение высоких доз или более частое введение вследствие экстенсивного метаболизма до неактивных или менее активных метabolитов. С помощью средств комбинированной терапии, описанных в данном документе, можно решить вышеупомянутые задачи, и при этом они могут обладать одним или несколь-

кими преимуществами, заключающимися, например, в синергизме, снижении количества дневных доз без утраты эффективности лекарственного средства, снижении уровня липидов (как холестерина, так и триглицеридов) у пациентов с повышенными уровнями липидов, устойчивыми к терапии при РВС, улучшении активности, селективности, проникновения в ткани, периода полувыведения и/или метаболической стабильности.

В композициях и способах настоящего изобретения первое соединение может представлять собой свободную кислоту, или оно может представлять собой фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой (например, конъюгат с глицином или таурином). В одном аспекте первое соединение представляет собой соединение формулы А. В одном аспекте первое соединение представляет собой обетихолевую кислоту (соединение 1). В одном аспекте первое соединение представляет собой соединение 2. В одном аспекте первое соединение представляет собой соединение 3, являющееся фармацевтически приемлемой солью. В одном аспекте первое соединение представляет собой соединение 4, являющееся фармацевтически приемлемой солью.

Фибрат, описанный в данном документе, может представлять собой любой фибрат. В одном примере фибрат выбран из группы, состоящей из фенофибрата, безафибрата, беклобрата, бинифибрата, ципрофибрата, клинофибрата, клофибрата, клофибриновой кислоты, этофибрата, гемифиброзила, никофибрата, пирифибрата, ронифибрата, симфибрата, теофибрата, токофибрата, плафибрида и их фармацевтически приемлемой соли и сложного эфира и производных 2-фенокси-2-метилпропановой кислоты, в которых феноксифрагмент замещен необязательно замещенным остатком пиперидина, 4-гидроксипиперидина, пиперид-3-ена или пиперазина, как раскрыто в публикации заявки на европейский патент № ЕР 0607536. В одном примере фибрат выбран из группы, состоящей из безафибрата, ципрофибрата, клофибрата, фенофибрата, гемифиброзила, бинифибрата, клинофибрата, клофибриновой кислоты, никофибрата, пирифибрата, плафибрида, ронифибрата, теофибрата, токофибрата и их фармацевтически приемлемой соли и сложного эфира и производных 2-фенокси-2-метилпропановой кислоты, в которых феноксифрагмент замещен необязательно замещенным остатком пиперидина, 4-гидроксипиперидина, пиперид-3-ена или пиперазина, как раскрыто в публикации заявки на европейский патент № ЕР 0607536. Примером последней группы веществ является 2-[3-[1-(4-фторбензоил)пиперидин-4-ил]фенокси-2-метилпропановая кислота. Например, фибрат представляет собой безафибрат, фенофибрат, гемифиброзил, ципрофибрат, клофибрат, клофибриновую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир. Например, фибрат представляет собой фенофибрат или его фармацевтически приемлемую соль, выбранную из холиновой, этаноламиновой, дигланоламиновой, пиперазиновой, кальциевой и трометаминовой соли. Например, фибрат представляет собой клофибрат или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, как, например, этофибрат или клофибрат алюминия. Например, фибрат представляет собой безафибрат. Например, фибрат представляет собой производное 2-фенокси-2-метилпропановой кислоты, такое как 2-[3-[1-(4-фторбензоил)-пиперидин-4-ил]феноксил-2-метилпропановая кислота.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой соединение формулы А в форме свободной кислоты, фибрат представляет собой безафибрат и его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения формулы А, по фибрат представляет собой безафибрат и его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой конъюгат соединения формулы А с глицином, по меньшей мере один фибрат представляет собой безафибрат и его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир.

В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой конъюгат соединения формулы А с таурином, фибрат представляет собой безафибрат и его фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, и по меньшей мере один фибрат представляет собой 2-[3-[1-(4-фторбензоил)-пиперидин-4-ил]феноксил-2-метилпропановую кислоту.

В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, и по меньшей мере один агонист PPAR-дельта представляет собой {4-[({4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3-тиазол-5-ил}метил)сульфанил]-2-метилфенокси}уксусную кислоту, {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2H-[1,2,3]тиазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту или [4-[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метил]тио]-2-метилфенокси]уксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, и по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту. В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль или

конъюгат с аминокислотой, и по меньшей мере один двойной агонист PPAR-альфа и гамма представляет собой алэглитазар, мураглитазар, тезаглитазар или сароглитазар или их фармацевтически приемлемую соль. В одном примере двойной агонист PPAR-альфа и дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(Е)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

В композициях и способах настоящего изобретения статин может представлять собой любой статин. В одном аспекте статин выбран из группы, состоящей из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой соединение формулы А в форме свободной кислоты, по меньшей мере один статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения формулы А, по меньшей мере один статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение представляет собой конъюгат соединения формулы А с глицином, по меньшей мере один статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

В одном варианте осуществления первого соединение представляет собой конъюгат соединения формулы А с таурином, по меньшей мере один статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастина, аторвастатина, церивастина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

Настоящая заявка также охватывает изотопно меченное первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой, которые имеют структуру, идентичную структуре первого соединения согласно настоящей заявке (например, соединения формулы А, I, IA, II или IIIA), за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, чаще всего встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в состав первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или конъюгата с аминокислотой, включают изотопы водорода, углерода, азота, фтора, такие как ^3H , ^{11}C , ^{14}C и ^{18}F .

Первое соединение или его фармацевтически приемлемая соль или конъюгат с аминокислотой, которые содержат вышеуказанные изотопы и/или другие изотопы других атомов, входят в объем настоящей заявки. Изотопно меченное первое соединение или его фармацевтически приемлемая соль или конъюгат с аминокислотой, например первое соединение, в состав которого включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и/или ^{14}C , являются применимыми для анализов распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Изотопы тритий, т.е. ^3H , и углерод-14, т.е. ^{14}C , применяются по причине простоты их получения и выявления. Кроме того, замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т.е. ^2H , может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью, например увеличение периода полувыведения *in vivo* или снижение требуемых доз, и, следовательно, может применяться при определенных условиях. Изотопно меченное первое соединение или его фармацевтически приемлемая соль или конъюгат с аминокислотой, как правило, можно получить посредством осуществления процедур, раскрытых на схемах и/или в примерах в настоящей заявке, посредством замены не меченного изотопами реагента легкодоступным изотопно меченым реагентом. В одном варианте осуществления обетихолевая кислота или ее фармацевтически приемлемые соли или конъюгаты с аминокислотами не являются изотопно меченными.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления заболевания или состояние представляет собой заболевание или состояние, опосредованное FXR. Примеры заболеваний или состояний, опосредованных FXR, включают без ограничения заболевания печени (в том числе холестатические и нехолестатические заболевания печени), такие как первичный билиарный цирроз (PBC), первичный склерозирующий холангит (PSC), билиарная атрезия, портальная гипертензия, хологенная диарея, хроническая печеночная недостаточность, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), инфицирование гепатитом С, алкогольная болезнь печени, поражение печени вследствие прогрессирующего фиброза и фиброз печени. Примеры заболеваний, опосредованных FXR, также включают гиперлипидемию, высокий уровень холестерина LDL, высокий уровень холестерина HDL, высокий уровень триглицеридов и

сердечно-сосудистое заболевание.

NAFLD представляет собой медицинское состояние, которое характеризуется скоплением жира (называемым жировой инфильтрацией) в печени. NAFLD является одной из наиболее распространенных причин хронической печеночной недостаточности и охватывает спектр состояний, ассоциированных с отложением липидов в гепатоцитах. Она охватывает диапазон от стеатоза (простой жировой болезни печени) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), до выраженного фиброза и цирроза. Данное заболевание является в большинстве случаев бессимптомным и часто обнаруживается случайно по повышенным уровням ферментов печени. NAFLD в значительной степени ассоциирована с ожирением и инсулинерезистентностью и в настоящее время многими считается печеночной составляющей метаболического синдрома.

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) представляет собой состояние, которое вызывает воспаление и накопление жировой и фиброзной (рубцовой) ткани в печени. Уровни ферментов печени в крови могут быть повышены в большей степени, чем в случае незначительных повышений, наблюдавшихся при неалкогольной жировой болезни печени (NAFL). Хотя аналогичные состояния могут иметь место у людей, которые злоупотребляют алкоголем, NASH имеет место у людей, которые употребляют алкоголь в малых количествах или не употребляют его. NASH поражает 2-5 процентов американцев и наиболее часто наблюдается у людей с одним или несколькими из следующих состояний: ожирение, сахарный диабет, гиперлипидемия, инсулинерезистентность, применение определенных медикаментов и воздействие токсинов. NASH становится все более распространенной причиной хронической печеночной недостаточности в мире и ассоциирован с повышенной смертностью, связанной с поражением печени, и гепатоцеллюлярной карциномой, даже при отсутствии цирроза. NASH прогрессирует до цирроза у 15-20% пораженных индивидуумов и в настоящее время является одним из основных показаний для трансплантации печени в США. На сегодняшний день не существует одобренных методов терапии NASH.

В одном варианте осуществления заболевания или состояние представляет собой гиперлипидемию. В одном варианте осуществления заболевания или состояние представляет собой холестатическое заболевание печени. В одном варианте осуществления заболевания или состояние представляет собой PBC. В другом варианте осуществления заболевания или состояние представляет собой сердечно-сосудистое заболевание. В другом варианте осуществления сердечно-сосудистое заболевание представляет собой атеросклероз, гиперхолестеринемию или гипертриглицеридемию.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения или предупреждения NAFLD или NASH. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения NAFLD или NASH, ассоциированных с гиперлипидемией. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения NASH. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения NASH, ассоциированного с гиперлипидемией.

В настоящем изобретении также представлен способ ингибиования или обеспечения регрессии фиброза, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления субъект не страдает от холестатического состояния. В другом варианте осуществления субъект страдает от холестатического состояния.

В одном варианте осуществления субъект не страдает от холестатического состояния, ассоциированного с заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из первичного рака печени и желчевыводящих путей (в том числе гепатоцеллюлярной карциномы), рака ободочной и прямой кишки, метастатического рака, сепсиса, хронического полного парентерального питания, муковисцидоза и гранулематозного заболевания печени. В вариантах осуществления фиброз, подлежащий ингибиованию или регрессии, имеет место в органе, в котором экспрессируется FXR.

В одном варианте осуществления холестатическое состояние определено как наличие аномально повышенного уровня щелочной фосфатазы, γ-глутамилтранспептидазы (GGT) и/или 5'-нуклеотидазы в сыворотке крови. В другом варианте осуществления холестатическое состояние дополнительно определено как проявляющееся в виде по меньшей мере одного клинического симптома. В одном варианте осуществления симптом представляет собой чесотку (зуд). В другом варианте осуществления холестатическое состояние выбрано из группы, состоящей из первичного билиарного цирроза (PBC), первичного склерозирующего холангита (PBS), холестаза, индуцированных лекарственными средствами, наследственного холестаза, билиарной атрезии и внутрипеченочного холестаза беременных.

В одном варианте осуществления фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза печени, фиброза почки и фиброза кишечника.

В одном варианте осуществления субъект имеет фиброз печени, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из гепатита B; гепатита C; паразитарных заболеваний печени; посттранспланационных бактериальных, вирусных и грибковых инфекций; алкогольной болезни печени (ALD); неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); неалкогольного стеатогепатита (NASH); заболеваний печени, индуцированных метотрексатом, изониазидом, оксифенистатином, метилдопой, хлорпромазином, толбутамидом или амиодароном; аутоиммунного гепатита; саркоидоза; болезни Вильсона;

гемохроматоза; болезни Гоше; болезней накопления гликогена III, IV, VI, IX и X типов; дефицита α_1 -антитрипсина; синдрома Цельвегера; тирозинемии; фруктоземии; галактоземии; сосудистого расстройства, ассоциированного с синдромом Бадда-Киари, веноокклюзионной болезнью или тромбофлебитом воротной вены; и врожденного фиброза печени.

В другом варианте осуществления субъект имеет фиброз кишечника, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из болезни Крона, неспецифического язвенного колита, лучевого колита и микроскопического колита.

В другом варианте осуществления субъект имеет ренальный фиброз, ассоциированный с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из диабетической нефропатии, гипертонического нефросклероза, хронического гломерулонефрита, хронической посттрансплантационной гломерулопатии, хронического интерстициального нефрита и поликистозного заболевания почек.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения или предупреждения всех форм состояний, связанных с повышенными уровнями липидов. В одном варианте осуществления состояние представляет собой гиперлипидемию, которая ассоциирована с состоянием, выбранным из резистентного первичного билиарного цирроза; первичного билиарного цирроза, с которым ассоциированы повышение показателей функциональных проб печени и гиперлипидемия, первичного склерозирующего холангита, стеатогепатита, не индуцированного алкоголем; и хронической печеночной недостаточности, ассоциированной с гепатитом В, С или употреблением алкоголя. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения гиперлипидемии, где гиперлипидемия представляет собой первичную гиперлипидемию с генетической составляющей или без нее или гиперлипидемию, ассоцииированную с заболеванием коронарных артерий, цереброваскулярным заболеванием артерий, заболеванием периферических сосудов, формами аневризмы аорты или атеросклерозом сонной артерии.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения первичного склерозирующего холангита с аналогичными биохимическими аномалиями, а также хронического гепатита, вызываемого вирусом гепатита В, С или употреблением алкоголя. В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения других артериальных нарушений, ассоциированных с гиперлипидемией. В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения или предупреждения гипертриглицеридемии.

В настоящем изобретении также представлен способ снижения уровней липидов (т.е. количества липидов), как, например, в крови, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней липидов по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенные уровни липидов по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровней липидов до нормальных уровней (например, сходных с уровнями липидов у индивидуума без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе).

В одном варианте осуществления липид представляет собой холестерин. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней холестерина по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенные уровни холестерина по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней холестерина ниже 400, 350, 300, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160 или 150 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней холестерина ниже 200, 190, 180, 170, 160 или 150 мг/л.

В одном варианте осуществления холестерин представляет собой LDL. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенные уровни LDL по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL ниже 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 или 50 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL ниже 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 или 50 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL ниже 130, 120, 110, 100, 90, 80,

70, 60 или 50 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL ниже 100, 90, 80, 70, 60 или 50 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней LDL ниже 70, 60 или 50 мг/л.

В одном варианте осуществления липид представляет собой триглицерид. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней триглицеридов по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенные уровни триглицеридов по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней триглицеридов ниже 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 или 100 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней триглицеридов ниже 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110 или 100 мг/л. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение уровней триглицеридов ниже 150, 140, 130, 120, 110 или 100 мг/л.

В настоящем изобретении также представлен способ снижения количества билирубина и/или одного или нескольких ферментов печени, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение количества билирубина по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенный уровень билирубина по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина до нормального уровня (например, сходного с уровнем билирубина у индивидуума без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина ниже 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1,2 или 1 мг/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня билирубина ниже 2, 1,5, 1,2 или 1 мг/л.

В одном варианте осуществления фермент печени выбран из группы, состоящей из щелочной фосфатазы (ALP, AP или Alk Phos), аланинаминотрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST), гамма-глутамилтранспептидазы (GGT), лактатдегидрогеназы (LDH) и 5'-нуклеотидазы. В одном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение количества одного или нескольких ферментов печени по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с контрольным субъектом (например, субъектом, которому не вводили композицию согласно настоящему изобретению). В одном варианте осуществления субъект имеет повышенные уровни одного или нескольких ферментов печени по сравнению со здоровым субъектом (например, индивидуумом без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе). В одном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровней одного или нескольких ферментов печени (например, ALP, ALT, AST, GGT, LDH и 5'-нуклеотидазы) до нормальных уровней (например, сходных с уровнями ферментов печени у индивидуума без заболевания или состояния, как заболевания или состояния, описанные в данном документе).

В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALP ниже 500 МЕ/л (международных единиц на литр), 400, 300, 200, 180, 160 или 150 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALP до от приблизительно 40 до приблизительно 150 МЕ/л.

В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALT ниже 200, 150, 100, 80, 60 или 50 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня ALT до от приблизительно 5 до приблизительно 50 МЕ/л.

В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня AST ниже 200, 150, 100, 80, 60, 50 или 40 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня AST до от приблизительно 10 до приблизительно 50 МЕ/л.

В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня GGT ниже 200, 150, 100, 90, 80, 70 или 60 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня GGT до от приблизительно 15 до приблизительно 50 МЕ/л или от приблизительно 5 до приблизительно 30 МЕ/л.

В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня LDH ниже 500, 400, 300, 200, 180, 160, 150, 140 или 130 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способ согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня LDH до от приблизи-

тельно 120 до приблизительно 220 МЕ/л.

В дополнительном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня 5'-нуклеотидазы ниже 50, 40, 30, 20, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 МЕ/л. В дополнительном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке обеспечивает снижение уровня 5'-нуклеотидазы до от приблизительно 2 до приблизительно 15 МЕ/л.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения, которое представляет собой агонист FXR, в комбинации по меньшей мере с одним агонистом PPAR-альфа, агонистом PPAR-дельта и/или двойным агонистом PPAR-альфа и дельта и необязательно одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В дополнительном варианте осуществления способа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения в комбинации по меньшей мере с одним агонистом PPAR-альфа, агонистом PPAR-дельта и/или двойным агонистом PPAR-альфа и дельта, где первое соединение представляет собой соединение, описанное в данном документе (например, соединение формулы A, I, IA, II или IIА или соединение 1, 2, 3 или 4), или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения, которое представляет собой агонист FXR, в комбинации по меньшей мере с одним фибратором и необязательно одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В дополнительном варианте осуществления способа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения в комбинации по меньшей мере с одним фибратором, где первое соединение представляет собой соединение, описанное в данном документе (например, соединение формулы A, I, IA, II или IIА или соединение 1, 2, 3 или 4), или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения, которое является агонистом FXR, в комбинации по меньшей мере с одним статином и необязательно одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В дополнительном варианте осуществления способа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения в комбинации по меньшей мере с одним статином, где первое соединение представляет собой соединение, описанное в данном документе (например, соединение формулы A, I, IA, II или IIА или соединение 1, 2, 3 или 4), или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения, которое является агонистом FXR, в комбинации по меньшей мере с одним агонистом PPAR-альфа, агонистом PPAR-дельта и/или двойным агонистом PPAR-альфа и дельта, по меньшей мере одним статином и необязательно одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В дополнительном варианте осуществления способа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения в комбинации по меньшей мере с одним агонистом PPAR-альфа, агонистом PPAR-дельта и/или двойным агонистом PPAR-альфа и дельта и по меньшей мере одним статином, где первое соединение представляет собой соединение, описанное в данном документе (например, соединение формулы A, I, IA, II или IIА или соединение 1, 2, 3 или 4), или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящей заявке включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения, которое является агонистом FXR, в комбинации по меньшей мере с одним фибратором, по меньшей мере одним статином и необязательно одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В дополнительном варианте осуществления способа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого соединения в комбинации по меньшей мере с одним фибратором и по меньшей мере одним статином, где первое соединение представляет собой соединение, описанное в данном документе (например, соединение формулы A, I, IA, II или IIА или соединение 1, 2, 3 или 4), или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В одном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение и фибратор (фибраторы) вводят в двухкомпонентной комбинации, т.е. без какого-либо терапевтического средства, отличного от первого соединения и фибрата (фибраторов). В одном варианте осуществления данного изобретения первое соединение и фибратор (фибраторы) вводят в трехкомпонентной комбинации со статином.

С помощью первого соединения вместе с агонистом(агонистами) PPAR-альфа, агонистом(агонистами) PPAR-дельта, двойным(двойными) агонистом(агонистами) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибратором (фибраторами) и/или статином (статинами) можно достигать значительных синергических эффектов, таких как синергическое снижение интенсивности тяжелых комбинированных и устойчивых к отдельным средствам терапии гиперлипидемических состояний и уровней одного или нескольких ферментов печени. Следовательно, с учетом чрезвычайно сложного контроля ги-

перлипидемий преиущественной является комбинация первого соединения, агониста PPAR-альфа, агониста PPAR-дельта, двойного агониста PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрата и/или статина. Может быть особенно предпочтительным, чтобы такая комбинация первого соединения, фибрата и/или статина была представлена в виде одной фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем (как, например, в форме одной капсулы), предназначеннной для повышения приверженности к лечению и, следовательно, эффективности. Соответственно, в настоящей заявке дополнительно описана фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество первого соединения, эффективное количество по меньшей мере одного агониста PPAR-альфа, агониста PPAR-дельта или двойного агониста PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма и эффективное количество по меньшей мере одного статина вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными средствами или наполнителями. В одном варианте осуществления в настоящей заявке дополнительно описана фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество первого соединения, эффективное количество по меньшей мере одного фибрата и эффективное количество по меньшей мере одного статина вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными средствами или наполнителями.

В одном примере первое соединение и агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) вводят одновременно. Например, первое соединение и агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) вводят вместе в одной фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем. В другом примере первое соединение и агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) вводят последовательно. Например, первое соединение вводят до или после агониста (агонистов) PPAR-альфа, агониста (агонистов) PPAR-дельта, двойного (двойных) агониста (агонистов) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрата (фибраторов).

В одном варианте осуществления первое соединение и статин вводят одновременно. Например, первое соединение и статин вводят вместе в одной фармацевтической композиции с фармацевтически приемлемым носителем. В другом варианте осуществления первое соединение и статин вводят последовательно. Например, первое соединение вводят до или после статина.

В одном варианте осуществления первое соединение вводят в первой дозе в течение первого периода времени с последующим введением первого соединения во второй дозе в течение второго периода времени. В одном варианте осуществления первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или конъюгат с аминокислотой вводят в общем дневном количестве, составляющем 0,1-1500, 0,2-1200, 0,3-1000, 0,4-800, 0,5-600, 0,6-500, 0,7-400, 0,8-300, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 4-26 или 5-25 мг, в течение первого периода времени с последующим введением первого соединения в общем дневном количестве, составляющем 0,1-1500, 0,2-1200, 0,3-1000, 0,4-800, 0,5-600, 0,6-500, 0,7-400, 0,8-300, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 4-26 или 5-25 мг. В одном варианте осуществления общее количество вводят перорально один раз в день. В одном варианте осуществления первая доза является отличной от второй дозы. В дополнительном варианте осуществления первая доза является более низкой, чем вторая доза. В другом варианте осуществления первая доза является более высокой, чем вторая доза. В одном варианте осуществления первая доза составляет приблизительно 5 мг (например, от 4,8 до 5,2 мг), и вторая доза составляет приблизительно 10 мг (например, от 9,8 до 10,2 мг). В одном варианте осуществления первый период времени составляет приблизительно 6 месяцев. В одном варианте осуществления второй период времени составляет приблизительно 6 месяцев.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят перорально, парентерально или местно. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят перорально.

Композиция в соответствии с настоящим изобретением, как правило, будет содержать достаточное количество соединений в композиции для обеспечения введения необходимой дневной дозы каждого из них субъекту, нуждающемуся в этом, в одной стандартной лекарственной форме, такой как таблетка или капсула, или в двух или более стандартных лекарственных формах, подлежащих введению одновременно или с интервалами в течение дня.

В настоящей заявке также описана фармацевтическая композиция, где первое соединение и агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраторы) вводят в комбинации с UDCA. В одном аспекте UDCA вводят в трехкомпонентной комбинации. В другом аспекте двухкомпонентную комбинацию первого соединения и агониста (агонистов) PPAR-альфа, агониста (агонистов) PPAR-дельта, двойного (двойных) агониста (агонистов) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрата(фибраторов) вводят для лечения или предупреждения заболевания или состояния вместо UDCA субъекту, у которого наблюдается неадекватный терапевтический ответ на UDCA в отдельности.

В способах согласно настоящему изобретению активные вещества можно вводить в одной дневной дозе или в двух, трех, четырех или более идентичных или различных разделенных дозах в день, и их

можно вводить одновременно или в разное время в течение дня. Обычно активные вещества вводят одновременно, чаще в одной комбинированной лекарственной форме.

В одном аспекте первое соединение, агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин (статины) вводят в дозах, по существу, аналогичных дозам, в которых их вводят при соответствующих режимах монотерапии. В одном аспекте первое соединение вводят в дозе, меньшей, чем его доза в режиме монотерапии (например, составляющей менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от нее). В одном аспекте агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) вводят в дозе, меньшей, чем их доза в режиме монотерапии (например, составляющей менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от нее). В одном аспекте как первое соединение, так и агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) вводят в дозах, меньших, чем их соответствующие дозы в режиме монотерапии (например, составляющих менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от них). В одном аспекте статин (статины) вводят в дозе, меньшей, чем его доза в режиме монотерапии (например, составляющей менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от нее). В одном аспекте как первое соединение, так и статин (статины) вводят в дозах, меньших, чем их соответствующие дозы в режиме монотерапии (например, составляющих менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от них). В одном аспекте первое соединение, агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин (статины) вводят в дозах, меньших, чем их соответствующие дозы в режиме монотерапии (например, составляющих менее 90, менее 80, менее 70, менее 60, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 или менее 10% от них).

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в любой удобной форме для перорального введения, такой как таблетка, капсула, порошок, лепешка, пилюля, пастилка, эликсир, лиофилизированный порошок, раствор, гранула, суспензия, эмульсия, сироп или настойка. Формы с медленным высвобождением, модифицированным высвобождением или отсроченным высвобождением также можно получить, например, в форме покрытых частиц, многослойных таблеток, капсул, заключенных в капсулы, таблеток, заключенных в капсулы, или микрограммов.

Твердые формы для перорального введения могут содержать фармацевтически приемлемые связующие вещества, подсластители, разрыхлители, разбавители, ароматизирующие средства, покрывающие средства, консерванты, смазывающие вещества и/или средства, отсчитывающие высвобождение. Подходящие связующие вещества включают аравийскую камедь, желатин, кукурузный крахмал, трагакантовую камедь, альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу или полиэтиленгликоль. Подходящие подсластители включают сахарозу, лактозу, глюкозу, аспартам или сахарин. Подходящие разрыхлители включают кукурузный крахмал, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, ксантановую камедь, бентонит, альгиновую кислоту или агар. Подходящие разбавители включают лактозу, сорбит, маннит, декстрозу, каolin, целлюлозу, карбонат кальция, силикат кальция или фосфат дикальция. Подходящие ароматизирующие средства включают масло перечной мяты, масло грушанки, вишневый, апельсиновый или малиновый ароматизатор. Подходящие покрывающие средства включают полимеры или сополимеры акриловой кислоты и/или метакриловой кислоты и/или их сложные эфиры, воски, жирные спирты, зеин, шеллак или глютен. Подходящие консерванты включают бензоат натрия, витамин Е, альфа-токоферол, аскорбиновую кислоту, метилпарабен, пропилпарабен или бисульфит натрия. Подходящие смазывающие вещества включают стеарат магния, стеариновую кислоту, олеат натрия, хлорид натрия или тальк.

Подходящие средства, отсчитывающие высвобождение, включают глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат.

Жидкие формы для перорального введения могут содержать, в дополнение к вышеуказанным средствам, жидкий носитель. Подходящие жидкие носители включают воду, масла, такие как оливковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, масло земляного ореха, кокосовое масло, жидкий парафин, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, этанол, пропанол, изопропанол, глицерин, жирные спирты, триглицериды или их смеси.

Суспензии для перорального введения могут дополнительно содержать диспергирующие средства и/или суспендирующие средства. Подходящие суспендирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, альгинат натрия или цетиловый спирт. Подходящие диспергирующие средства включают лецитин, сложные эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, таких как стеариновая кислота, полиоксиэтиленсорбитомоно(ди)олеат, -стеарат или -лаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоно(ди)олеат, -стеарат или -лаурат и т.п.

Эмульсии для перорального введения могут дополнительно содержать одно или несколько эмульгирующих средств. Подходящие эмульгирующие средства включают диспергирующие средства, проиллюстрированные выше, или природные камеди, такие как аравийская камедь или трагакантовая камедь.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно получить посредством сухого смешивания, измельчения, гомогенизации, суспензирования, растворения, эмульгирования, диспергирования и/или смешивания первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой и по меньшей мере одного гиполипидемического средства, например фибрата, и необязательно статина (статинов) вместе с выбранными наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным (вспомогательными) средством (средствами) и/или разбавителем (разбавителями). Один тип фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в форме таблетки или капсулы можно получить посредством (а) получения первой таблетки, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой, и по меньшей мере одно гиполипидемическое средство вместе с любыми желаемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным (вспомогательными) средством (средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (б) получения второй таблетки или капсулы, где вторая таблетка или капсула содержит остатальное количество активного (активных) вещества (веществ) и первую таблетку. Другой тип фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в форме капсулы можно получить посредством (а) получения первой капсулы, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой, и гиполипидемическое (гиполипидемические) средство (средства) вместе с любыми желаемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным (вспомогательными) средством (средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (б) получения второй капсулы, где вторая капсула содержит остатальное количество активного (активных) вещества (веществ) и первую капсулу. Дополнительный тип фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в форме таблетки можно получить посредством (а) получения капсулы, содержащей по меньшей мере одно из активных веществ, выбранных из первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой, и по меньшей мере одно гиполипидемическое средство вместе с любыми желаемыми наполнителем (наполнителями), носителем (носителями), вспомогательным (вспомогательными) средством (средствами) и/или разбавителем (разбавителями), и (б) получения таблетки, где таблетка содержит остатальное количество активного (активных) вещества (веществ) и капсулу.

В вариантах осуществления агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин(статины) применяют в качестве таблетки с немедленным высвобождением либо в качестве таблетки с замедленным высвобождением. Они являются особенно эффективными, будучи представленными в виде таблетки с замедленным высвобождением. Таблетки с замедленным высвобождением с различными гиполипидемическими средствами являются коммерчески доступными. Для пролонгированного действия предпочтительно, чтобы таблетка была представлена в формате с замедленным высвобождением.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит капсулу, содержащую агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин (статины), заключенную в капсулу, содержащую первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой. Как правило, в этой форме агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист(агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин (статины) представлены в форме с немедленным высвобождением. В этом случае обычным является введение композиции три раза в день. Другой режим введения заключается в предоставлении композиции, содержащей агонист (агонисты) PPAR-альфа, агонист (агонисты) PPAR-дельта, двойной (двойные) агонист (агонисты) PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат (фибраты) и/или статин (статины), в форме с замедленным высвобождением либо с незамедленным высвобождением, описанной выше, два раза в день, где дневное количество вводимой композиции содержит достаточное количество активных веществ для предоставления пациенту необходимой дневной дозы.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой лекарственную форму, которая содержит первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой в общем дневном количестве, составляющем 0,1-1500, 0,2-1200, 0,3-1000, 0,4-800, 0,5-600, 0,6-500, 0,7-400, 0,8-300, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 4-26 или 5-25 мг. В одном варианте осуществления общее количество вводят перорально один раз в день.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой лекарственную форму, которая содержит агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат и/или статин в общем дневном количестве, составляющем 10-1000, 20-800, 50-500, 80-400 или 100-300 мг, чаще всего приблизительно 200 мг. В одном варианте осуществления общее количество вводят перорально один раз в день. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой лекарственную форму, которая содержит статин в количестве, составляющем 5-1000, 10-

800, 20-500, 30-400 или 40-200 мг.

В вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению представляют собой лекарственную форму, которая содержит агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат и/или статин в количестве, составляющем 10-1000, 20-800, 50-500, 80-400 или 100-300 мг, чаще всего приблизительно 200 мг, содержащуюся в капсуле, которая содержит первое соединение в количестве, составляющем 0,1-1500, 0,2-1200, 0,3-1000, 0,4-800, 0,5-600, 0,6-500, 0,7-400, 0,8-300, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 4-26 или 5-25 мг. В одном варианте осуществления агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибрат и/или статин представлен в форме с замедленным высвобождением.

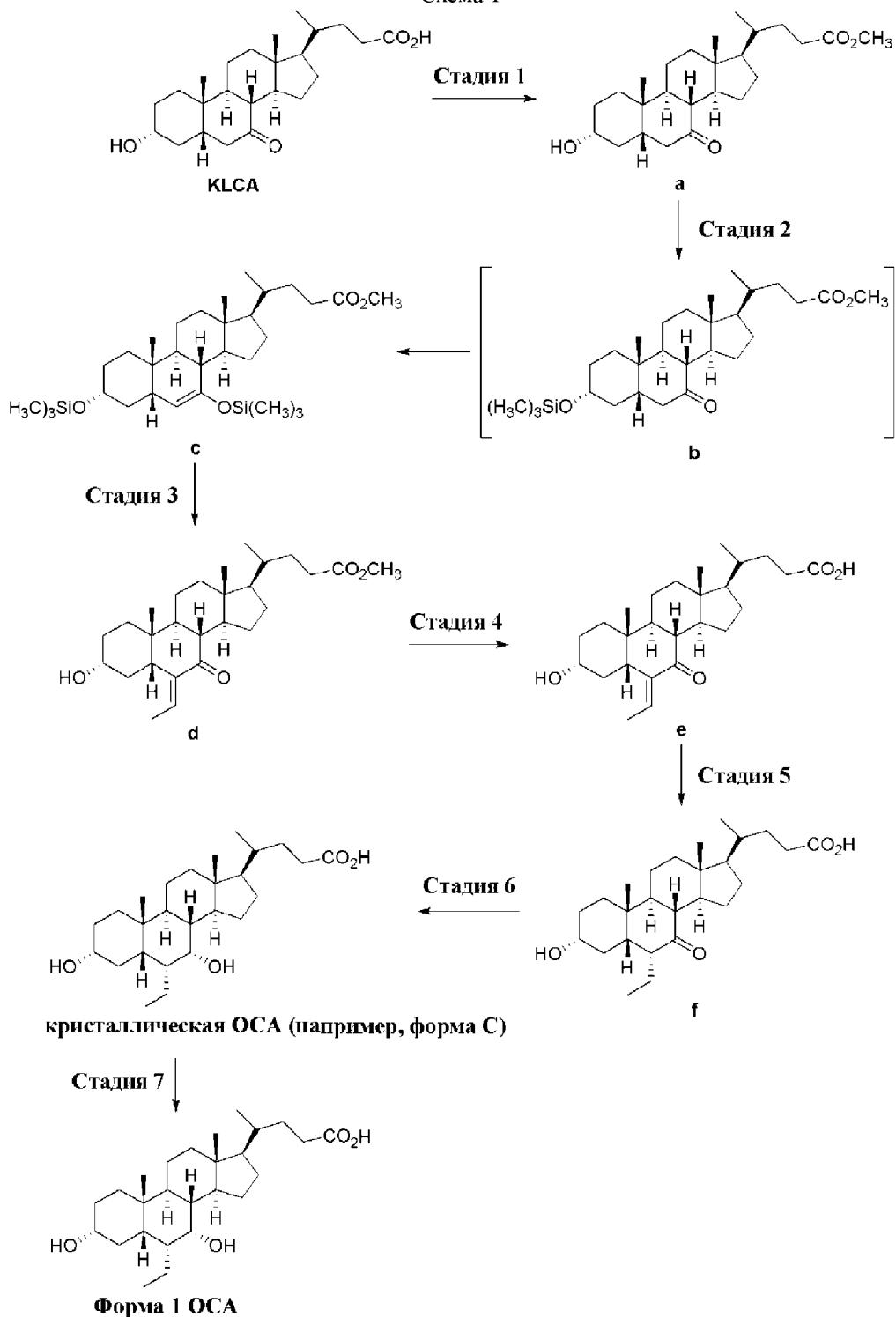
В вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению представляют собой лекарственную форму, которая содержит таблетку безафибрата с замедленным высвобождением в количестве, составляющем 10-1000, 20-800, 50-500, 80-400 или 100-300 мг, чаще всего приблизительно 200 мг, содержащуюся в капсуле, которая содержит первое соединение в количестве, составляющем 0,1-1500, 0,2-1200, 0,3-1000, 0,4-800, 0,5-600, 0,6-500, 0,7-400, 0,8-300, 1-200, 1-100, 1-50, 1-30, 4-26 или 5-25 мг. В этом случае пациент, которому вводят лекарственную форму, принимает таблетку безафибрата с замедленным высвобождением, который доставляется в дистальный антравальный отдел желудка по мере того, как капсула раскрывается и высвобождает первое соединение.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может применяться в течение всей жизни пациентом, продлевая его выживание и отсрочивая трансплантацию печени. Снижение интенсивности гиперлипидемии и уровней ферментов печени обеспечивает замедление развития ассоциированного сосудистого заболевания. Как первое соединение, так и гиполипидемические средства, такие как фибраты и/или статины, характеризуются весьма незначительным профилем долгосрочных побочных эффектов (за некоторыми исключениями для безафибрата), и, таким образом, данная комбинация, вероятно, является наиболее подходящим средством терапии первичного билиарного цирроза (PBC) с гиперлипидемией и резистентного первичного билиарного цирроза (PBC). Ввиду упрощенного дозирования, представленного в настоящем изобретении, комбинированную терапию согласно настоящему изобретению можно применять в возрастающих дозах в зависимости от веса пациента и клинического эффекта.

Композиция согласно настоящему изобретению, которая содержит первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль или коньюгат с аминокислотой, агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма, или фибрат, и/или статин, может быть представлена в виде трех активных веществ, заключенных в одну капсулу. В одной форме такой композиции статин может быть смешан с первым соединением во внутренней капсуле, при этом внутренняя капсула окружена агонистом PPAR-альфа, агонистом PPAR-дельта, двойным агонистом PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибратором, содержащимися в наружной капсule. Расположение в капсулах может быть обратным. Иными словами, смесь статина и первого соединения может содержаться в наружной капсule, а агонист PPAR-альфа, агонист PPAR-дельта, двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма или фибратор могут содержаться во внутренней капсule. Данный порядок расположения будет особенно желательным в случае, если количество статина, подлежащего введению, является относительно большим. Возможны другие комбинации для введения комбинации трех активных веществ.

Первое соединение, раскрытое в данном документе, можно получить с помощью традиционных способов (например, раскрытых в публикации заявки на патент США № 2009/0062526, в патенте США № 7138390 и в WO 2006/122977), как, например, с помощью 6-стадийного синтеза с последующей одной стадией очистки с получением соединения 1 (обетихоловой кислоты, или ОСА) высокой степени чистоты, как показано на схеме 1 ниже.

Схема 1

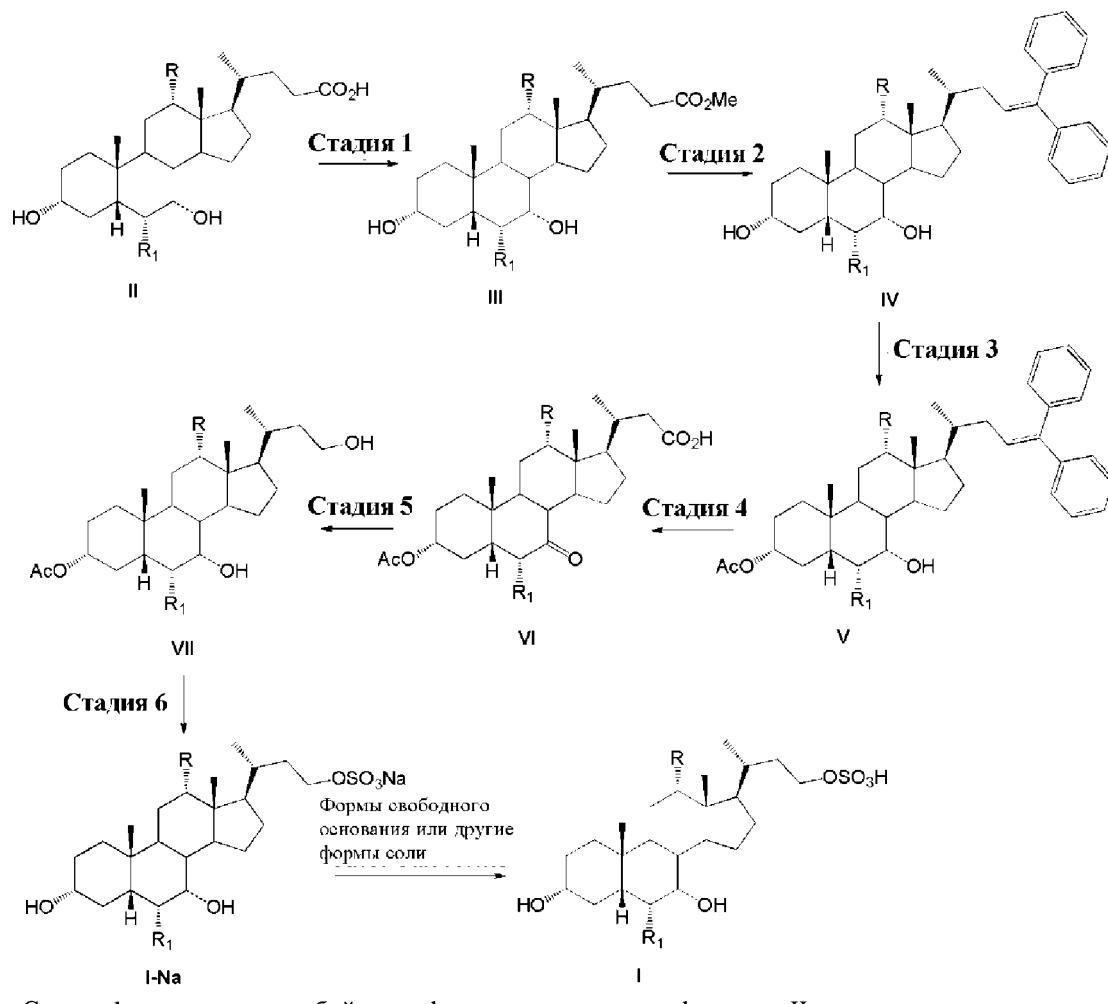


Вышеуказанный способ был описан в WO 2013/192097, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Данный способ представляет собой 6-стадийный синтез с последующей одной стадией очистки.

Стадия 1 представляет собой этерификацию C-24-карбоновой кислоты, представляющей собой 7-кетолитохолевую кислоту (KLCA), с получением метилового сложного эфира, представляющего собой соединение (a). Стадия 2 представляет собой образование силиленолового эфира из соединения 1 с получением соединения (c). Стадия 3 представляет собой реакцию альдольной конденсации силиленолового эфира, представляющего собой соединение (c), и ацетальдегида с получением соединения (d). Стадия 4 представляет собой омыление соединения (d) с получением соединения (e). Стадия 5 представляет собой гидрогенизацию соединения (e) с получением соединения (f). Стадия 6 представляет собой избирательное восстановление 7-кетогруппы соединения (f) с получением кристаллического соединения 1. Стадия 7 представляет собой превращение кристаллического соединения в аморфное соединение 1 (форму 1 обе-

тихолевой кислоты или формулу 1 ОСА).

В качестве альтернативы первое соединение, раскрытое в данном документе, можно получить с помощью традиционных способов (например, описанных в патенте США № 7932244) или посредством способа, показанного на схеме 2 (и раскрытоого в WO 2014/066819). Схему 2 можно использовать для получения соединений 2, 3 или 4, раскрытых в данном документе.



Стадия 1 представляет собой этерификацию соединения формулы II с получением соединения формулы III. Стадия 2 представляет собой реакцию образования соединения формулы IV из соединения формулы III. Стадия 3 представляет собой введение защитной группы для гидроксильной группы в положении С3 соединения формулы IV с получением соединения формулы V. Стадия 4 представляет собой окислительное расщепление соединения формулы V с получением соединения формулы VI. Стадия 5 представляет собой восстановление соединения формулы VI с получением соединения формулы VII. Стадия 6 представляет собой сульфирование соединения формулы VII с получением соли формулы I-Na. Соль формулы I-Na можно превратить в ее форму свободного основания (т.е. соединение формулы I) или другие формы соли (например, соль формулы I-(Et)₃NH).

Определения

Для удобства определенные термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, собраны здесь.

Используемый в данном документе термин "фибрат" означает любые производные фиброевой кислоты и фармацевтически активные производные 2-фенокси-2-метилпропановой кислоты, применимые в способах, описанных в данном документе. Примеры фибратов включают без ограничения фенофибрат, безафибрат, беклобрат, бинифбрат, ципрофибрат, клинофибрат, клофибрат, клофибриновую кислоту, эзофибрат, гемфиброзил, никофибрат, пирифибрат, ронифибрат, симфибрат, теофибрат, токофибрат, плафибрид и т.д. Примеры фибратов также описаны в патентах США №№ 3781328, 3948973, 3869477, 3716583, 3262580, 3723446, 4058552, 3674836, 3369025, 3984413, 3971798, 6384062, 7119198 и 7259186; публикации заявки на патент США № 20090131395; WO 2008/039829; патенте Бельгии № 884722; патенте Великобритании № 860303 и публикации заявки на европейский патент EP 0607536, полное раскрытие каждого из каковых документов включено в данный документ посредством ссылки.

Альфа-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR-альфа), также известный как NR1C1 (член 1 группы С подсемейства ядерных рецепторов 1), представляет собой ядерный рецептор-

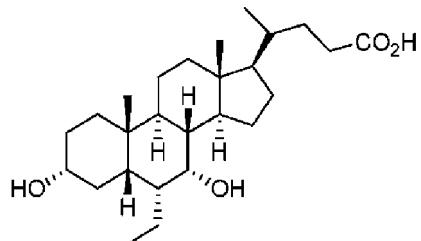
ный белок. Агонист PPAR-альфа связывается с PPAR-альфа и активирует его. Примеры агониста PPAR-альфа включают без ограничения фибрат, такой как фибраты, описанные в данном документе.

Дельта-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR-дельта), также известный как NR1C2 (член 2 группы С подсемейства ядерных рецепторов 1), представляет собой ядерный рецепторный белок. Агонист PPAR-дельта связывается с PPAR-дельта и активирует его. Примеры агониста PPAR-дельта включают без ограничения {4-[({4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-1,3-тиазол-5-ил}метил)сульфанил]-2-метилфенокси}уксусную кислоту (также известную из уровня техники как GW501516, GW1516 и эндуробол), {2-метил-4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)-2H-[1,2,3]тиазол-4-илметилсульфанил]фенокси}уксусную кислоту и [4-[[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метилтио]-2-метилфенокси]уксусную кислоту.

Двойной агонист PPAR-альфа и дельта или PPAR-альфа и гамма связывается как с PPAR-альфа, так и с PPAR-дельта или как с PPAR-альфа, так и с PPAR-гамма и активирует их. Примеры двойного агониста PPAR-альфа и дельта включают без ограничения 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(E)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту (также известную как GFT505). Примеры двойных агонистов PPAR-альфа и гамма включают без ограничения алеглитазар ((2S)-2-метокси-3-[4-[2-(5-метил-2-фенил-4-оксазолил)этокси]-7-бензотиофенил]пропановую кислоту, № CAS 475479-34-6), мураглитазар (N-[4-метоксифенокси]карбонил)-N-{4-[2-(5-метил-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил)этокси]бензил}глицин, № CAS 331741-94-7), тезаглитазар ((2S)-2-этокси-3-[4-[2-(4-метилсульфонилоксифенил)этокси]фенил]пропановую кислоту, № CAS 251565-85-2) и сароглитазар ((2S)-2-этокси-3-[4-(2-{2-метил-5-[4-(метилсульфанил)фенил]-1H-пиррол-1-ил}этокси)фенил]пропановую кислоту, № CAS 495399-09-2).

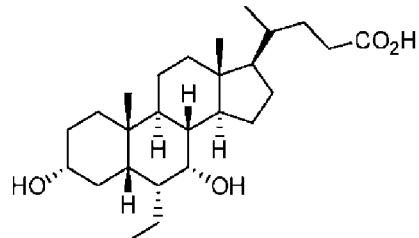
Используемый в данном документе термин "агонист FXR" относится к любому соединению, которое активирует FXR. В одном аспекте посредством агониста FXR достигается по меньшей мере 50% активация FXR по сравнению с CDCA, соответствующим положительным контролем в аналитических способах, описанных в WO 2000/037077. В другом аспекте посредством агониста FXR достигается 100% активация FXR в сцинтилляционном анализе сближения или HTRF-анализе, описанных в WO 2000/037077. Примеры агонистов FXR включают без ограничения агонисты FXR, описанные в патентных документах США 7138390; 7932244; 20120283234; 20120232116; 20120053163; 20110105475; 20100210660; 20100184809; 20100172870; 20100152166; 20100069367; 20100063018; 20100022498; 20090270460; 20090215748; 20090163474; 20090093524; 20080300235; 20080299118; 20080182832; 20080039435; 20070142340; 20060069070; 20050080064; 20040176426; 20030130296; 20030109467; 20030003520; 20020132223 и 20020120137.

Используемый в данном документе термин "обетихолевая кислота" или "ОСА" относится к соединению, имеющему следующую химическую структуру:



Обетихолевая кислота также упоминается как форма 1 обетихолевой кислоты, INT-747, 3 α ,7 α -дигидрокси-6 α -этил-5 β -холан-24-овая кислота, 6 α -этилхенодезоксихолевая кислота, 6-этил-CDCA, 6ECDC, 6-этил-3,7-дигидрокси-(3 α ,5 β , 6 α ,7 α)-холан-24-овая кислота, и ее можно получить посредством способов, описанных в публикации заявки на патент США № 2009/0062526 A1, патенте США № 7138390 и WO 2006/122977. Регистрационным номером CAS обетихолевой кислоты является 459789-99-2.

Используемый в данном документе термин "кристаллическая обетихолевая кислота" относится к любой кристаллической форме соединения, имеющего следующую химическую структуру:



Кристаллическая обетихолевая кислота означает, что соединение кристаллизуется в виде определенной упорядоченной структуры с упаковкой кристалла в трех пространственных измерениях или соединение имеет плоскости наружных граней. Кристаллическая форма обетихолевой кислоты (или ее фармацевтически приемлемой соли) может кристаллизоваться в виде различных упорядоченных струк-

тур с упаковкой кристалла, при этом все они имеют один и тот же элементный состав обетихолевой кислоты. Различные кристаллические формы обычно характеризуются различными дифракционными рентгенограммами, инфракрасными спектрами, точками плавления, плотностью, твердостью, формой кристаллов, оптическими и электрическими свойствами, стабильностью и растворимостью. Растворитель для перекристаллизации, скорость кристаллизации, температура хранения и другие факторы могут обуславливать доминирование одной кристаллической формы. Кристаллы обетихолевой кислоты можно получить посредством кристаллизации при различных условиях, например с различными растворителями, температурами и т.д. Примеры кристаллических форм ОСА описаны в патенте США № 9238673.

Термин "первое соединение" означает соединение формулы A, I, IA, II или IIА, или соединение 1, 2, 3 или 4, или его фармацевтически приемлемую соль, или конъюгат с аминокислотой. Во всех случаях, когда данный термин используется в контексте настоящего изобретения, следует понимать, что ссылка делается на свободное основание, изотопно меченное соединение, кристаллическое соединение или его соответствующие фармацевтически приемлемую соль или конъюгаты с аминокислотой, при условии, что такое является возможным и/или приемлемым при данных обстоятельствах.

Используемый в данном документе термин "конъюгаты с аминокислотами" относятся к конъюгатам первого соединения согласно настоящему изобретению (например, соединения формулы A) с любой подходящей аминокислотой. Например, такой подходящий конъюгат соединения формулы A с аминокислотой будет обладать дополнительным преимуществом, заключающимся в повышенной целостности в желчи или кишечном соке. Подходящие аминокислоты включают без ограничения глицин и таурин. Таким образом, настоящее изобретение охватывает конъюгаты первого соединения согласно настоящему изобретению (например, соединения 1) с глицином и таурином.

Термин "статин" является синонимическим по отношению к терминам "ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазы" и "ингибитор HMG-CoA-редуктазы". Эти термины используются взаимозаменяющими в данном документе. Как свидетельствует синонимичность, статины представляют собой ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазы и в связи с этим являются эффективными в снижении уровня холестерина в плазме крови и соответственно для лечения или предупреждения сердечно-сосудистых заболеваний. Статины и их фармацевтически приемлемые соли являются особенно применимыми в снижении уровней холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) у млекопитающих, и в частности у людей. В своей структуре статины или их производные имеют общую 4-гидрокси-6-оксо-2Н-пирановую систему, которая также может находиться в форме дигидрокислоты и которая взаимодействует с активным центром HMG-CoA-редуктазы, и липофильную часть, которая представлена, в частности, в виде полизамещенной гексагидроафталиновой системы, но также может быть заменена полизамещенной гетероароматической системой, как у аторвастатина или флувастина. Статин, подходящий для применения в данном документе, включает без ограничения симвастатин, флувастиatin, правастатин, ривастиatin, мевастиatin, аторвастиatin, церивастиatin, ловастиatin, питавастиatin, флуиндолстatiн, велостatiн, далвастиatin, розувастиatin, дигидрокомпактин и компактин или их фармацевтически приемлемую соль.

Термин "гиполипидемическое средство" относится к любому средству, которое способно снижать концентрацию липида (например, холестерина, LDL и триглицерида) в циркулирующей жидкости (например, в крови). Гиполипидемическое средство включает без ограничения (i) секвестрант желчных кислот, такой как смола (например, холестирамин, колестипол, колесевелам), (ii) ингибитор всасывания холестерина, который предупреждает поглощение холестерина (например, из тонкого кишечника в кровеносную систему), такой как эзетимиб (т.е. (3R,4S)-1-(4-фторфенил)-3-[(3S)-3-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]-4-(4-гидроксифенил)азетидин-2-он) и (3R,4S)-1,4-бис(4-метоксифенил)-3-(3-фенилпропил)-2-азетидинон), (iii) этиловые сложные эфиры омега-3-жирных кислот, в том числе производные свободных жирных кислот (например, Omacor®, Lovaza®, Vascepa™, Epadel, Epanova™) или омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты, полученные из морепродуктов (PUFA), (iv) ингибиторы PCSK9, (v) никотиновую кислоту, (vi) фитостерины (например, растительные стерины и станолы), такие как β-ситостерин, кампестерин, стигмастерин, брассикастерин, эргостерин, β-ситостанол, кампестанол, стигмастанол, циклоартенол и лупеол, (vii) ингибиторы CETP (белка-переносчика холестериновых эфиров), такие как анацетрапиб, эвацетрапиб, торцетрапиб и далцетрапиб, (viii) ингибиторы скваленсинтазы, (ix) антисмыловые олигонуклеотиды, которые воздействуют на синтез, разложение, всасывание и метаболизм липидов (например, антисмыловые олигонуклеотиды, которые связываются с мРНК, кодирующими аполипопротеин B или PCSK9) (например, mipomersen (кинамро)), (x) ингибиторы апопротеина B, (xi) ингибиторы микросомального белка-транспортера триглицеридов (например, ломитапид (джукстапид)) и (xii) другие соединения, такие как колесевелам, авазимби и имплитапид.

"Осуществление лечения" включает любой эффект, например уменьшение интенсивности, снижение интенсивности, модулирование или устранение, который приводит в результате к улучшению течения состояния, заболевания, нарушения и т.д. "Осуществление лечения" или "лечение" болезненного состояния включает ингибирование болезненного состояния, т.е. прекращение развития болезненного состояния или его клинических симптомов, или облегчение болезненного состояния, т.е. обуславливание

временной или постоянной ремиссии болезненного состояния или его клинических симптомов.

"Предупреждение" болезненного состояния включает обуславливание отсутствия развития клинических симптомов болезненного состояния у субъекта, который может быть подвержен болезненному состоянию или предрасположен к нему, но который еще не испытывает или у которого еще не проявляются симптомы болезненного состояния.

Термин " осуществление ингибиования" или "ингибиование", используемый в данном документе, относится к любому выявляемому положительному эффекту в отношении развития или прогрессирования заболевания или состояния. Такой положительный эффект может включать задержку или предупреждение начала проявления по меньшей мере одного симптома или признака заболевания или состояния, смягчение или обеспечение регрессии симптома (симптомов) или признака (признаков) и замедление или предупреждение дальнейшего усугубления симптома (симптомов) или признака (признаков).

"Болезненное состояние" означает любое заболевание, нарушение, состояние, симптом или показание.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", используемый в данном документе, относится к количеству первого соединения (например, лиганда, активирующего FXR), или фибрата, или гиполипидемического средства, или статина, которое вызывает кратковременный или длительный терапевтический эффект при введении соответствующей дозы в отдельности или в комбинации. В одном варианте осуществления эффективное количество или терапевтически эффективное количество первого соединения (например, лиганда, активирующего FXR) вызывает кратковременный или длительный терапевтический эффект при введении соответствующей дозы в комбинации по меньшей мере с одним фибратором. Данный эффект включает предупреждение, коррекцию, ингибиование или обеспечение регрессии симптомов, признаков заболевания/состояния (например, фиброза печени, почки или кишечника) и лежащего в его основе патологического процесса, а также связанных с ним осложнений, в любой выявляемой степени. "Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" будет варьироваться в зависимости от первого соединения, фибрата, гиполипидемического средства, статина, заболевания и его тяжести и возраста, веса и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

Терапевтически эффективное количество первого соединения может быть составлено вместе с одним или несколькими фибраторами и необязательно с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями для введения человеку или животному, отличному от человека. Соответственно фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить, например, посредством перорального, парентерального или местного путей с предоставлением эффективного количества первого соединения и фибрата (фибраторов). В альтернативных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению можно применять для покрытия или пропитывания медицинского изделия, например стента.

"Фармакологический эффект", как используется в данном документе, охватывает эффекты, полученные у субъекта, посредством которых достигается намеченная цель терапии. В одном варианте осуществления фармакологический эффект означает, что у субъекта, лечение которого осуществляется, имеет место предупреждение, смягчение или снижение интенсивности проявления первичных показаний. Например, фармакологический эффект будет представлять собой эффект, который приводит в результате к предупреждению, смягчению или снижению интенсивности проявления первичных показаний у субъекта, лечение которого осуществляется. В другом варианте осуществления фармакологический эффект означает, что у субъекта, лечение которого осуществляется, имеет место предупреждение, смягчение или снижение интенсивности проявления нарушений или симптомов в качестве первичных показаний. Например, фармакологический эффект будет представлять собой эффект, который приводит в результате к предупреждению, смягчению или снижению интенсивности проявления нарушений или симптомов у субъекта, лечение которого осуществляется.

Следует понимать, что изомеры, существование которых обусловлено наличием асимметрических атомов углерода (например, все энантиомеры и диастереомеры), включены в объем настоящего изобретения, если не указано иное. Такие изомеры можно получить в практически чистой форме посредством классических методик разделения и посредством стереохимически контролируемого синтеза.

"Фармацевтическая композиция" представляет собой состав, содержащий терапевтические средства, такие как первое соединение и гиполипидемическое средство, такое как фибратор, в форме, подходящей для введения субъекту. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в виде нерасфасованной или стандартной лекарственной формы. Может быть предпочтительным составление композиций в виде стандартной лекарственной формы для облегчения введения и обеспечения равномерности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически обособленным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъекта, лечение которого осуществляется; при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного реагента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, совместно с требуемым фармацевтическим носителем. Технические требования к стандартным лекарственным формам согласно настоящему изобретению прописаны уникальными характеристиками активных средств, а также конкретным терапевтическим эффектом, который должен быть достигнут, и ограничениями, присущими области приготовления такого активного средства для лечения индивидуумов,

и непосредственно зависят от них.

Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически обособленным единицам, пригодным в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, совместно с подходящим фармацевтическим наполнителем, описанным в данном документе.

Стандартная лекарственная форма представляет собой любую из множества форм, в том числе, например, капсулу, пакет для IV-вливания, таблетку, одноцилиндровый насос в аэрозольном ингаляторе или флакон. Количество первого соединения или его фармацевтически приемлемой соли или коньюгата с аминокислотой в разовой дозе композиции представляет собой эффективное количество и варьируется в зависимости от конкретного рассматриваемого вида лечения и/или гиполипидемического (гиполипидемических) средства (средств), применяемого (применяемых) для лечения. Специалисту в данной области будет понятно, что иногда необходимо производить стандартные изменения дозы в зависимости от возраста и состояния пациента. Доза также будет зависеть от пути введения. Предполагается множество путей, в том числе пероральный, внутрилегочный, ректальный, парентеральный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, ингаляционный, трансбукиальный, сублингвальный, интраплевральный, интратекальный, интраназальный и т.п. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения согласно настоящему изобретению включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и средства для ингаляции. В одном варианте осуществления первое соединение и/или гиполипидемическое средство смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или распыляющими веществами, которые являются необходимыми.

Термин "мгновенная доза" относится к составам, которые представляют собой быстродиспергируемые лекарственные формы.

Термин "немедленное высвобождение" определяется как высвобождение терапевтического средства (такого как первое соединение или гиполипидемическое средство) из лекарственной формы за относительно короткий период времени, как правило, приблизительно до 60 мин. Термин "модифицированное высвобождение" определяется как включающий отсроченное высвобождение, продленное высвобождение и прерывистое высвобождение. Термин "прерывистое высвобождение" определяется как серия событий высвобождения лекарственного средства из лекарственной формы. Термин "замедленное высвобождение" или "продленное высвобождение" определяется как непрерывное высвобождение терапевтического средства из лекарственной формы в течение продолжительного периода.

"Субъект" включает млекопитающих, например людей, животных-компаньонов (например, собак, кошек, птиц и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей, домашнюю птицу и т.п.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок, птиц и т.п.). В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В одном аспекте субъект представляет собой особь женского пола. В одном аспекте субъект представляет собой особь мужского пола.

Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемый" относится к таким соединениям, материалам, композициям, носителям, и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями людей и животных при отсутствии излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риска.

"Фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель" означает носитель или наполнитель, который является применимым в получении фармацевтической композиции, которая в целом является безопасной, нетоксичной и ни с биологической, ни с иной точки зрения не является нежелательной, и включает наполнитель, который является приемлемым для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения в отношении человека. "Фармацевтически приемлемый наполнитель", как используется в описании и формуле изобретения, включает как один, так и более чем один такой наполнитель.

Хотя возможно вводить первое соединение непосредственно без какого-либо составления, первое соединение можно вводить в форме фармацевтического состава, содержащего фармацевтически приемлемый наполнитель. Данный состав можно вводить посредством множества путей, в том числе перорального, трансбукиального, ректального, интраназального, трансдермального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и интраназального.

В одном варианте осуществления первое соединение можно вводить трансдермально. Для трансдермального введения необходимо средство трансдермальной доставки ("пластырь"). Такие трансдермальные пластыри можно применять для обеспечения непрерывной или прерывистой инфузии соединения согласно настоящему изобретению в контролируемых количествах. Конструкция и применение трансдермальных пластырей для доставки фармацевтических средств широко известны из уровня техники. См., например, патент США № 5023252. Такие пластыри могут быть сконструированы для непрерывной, пульсирующей доставки фармацевтических средств или доставки фармацевтических средств по мере необходимости.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приспособлена для трансбукиального, и/или сублингвального, или назального введения.

В данном варианте осуществления представлено введение первого соединения таким образом, что это позволяет избежать осложнений со стороны желудка, таких как эффект первого прохождения через желудочную систему и/или через печень. Этот способ введения также может обуславливать уменьшение времени всасывания, обеспечивая при этом более быстрое начало проявления терапевтических полезных эффектов.

Первое соединение можно вводить в пределах широкого диапазона доз. Например, дневные дозы обычно находятся в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 30 мг/кг веса тела. При лечении взрослых людей можно использовать диапазон от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мг/кг/день в виде однократной дозы или разделенной дозы. В одном варианте осуществления состав содержит от приблизительно 0,1 до приблизительно 1500 мг первого соединения. В другом варианте осуществления состав содержит от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг первого соединения. В другом варианте осуществления состав содержит от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг первого соединения. В другом варианте осуществления состав содержит от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг первого соединения. В другом варианте осуществления состав содержит от приблизительно 4 до приблизительно 26 мг первого соединения. В другом варианте осуществления состав содержит от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг первого соединения. Однако будет понятно, что фактически вводимое количество первого соединения будет определяться врачом с учетом соответствующих обстоятельств, в том числе состояния, подлежащего лечению, выбранного пути введения, формы вводимого первого соединения, вводимого (вводимых) гиполипидемического (гиполипидемических) средства (средств), возраста, веса и ответа отдельного пациента, а также тяжести симптомов пациента. Следовательно, вышеуказанные диапазоны доз не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения какимлибо образом. В некоторых случаях уровни дозы, более низкие, чем нижний предел вышеуказанного диапазона, могут быть более чем достаточными, при этом в других случаях по-прежнему могут использоваться более высокие дозы без обуславливания какого-либо пагубного побочного эффекта, при условии, что такие более высокие дозы вначале разделяют на несколько меньших доз для введения в течение дня.

"Фиброз" относится к состоянию, предполагающему формирование избыточного количества грубоволокнистой соединительной ткани, например рубцовой ткани, в ткани или органе. Такое образование рубцовой ткани может происходить в ответ на инфекцию, воспаление или повреждение органа вследствие заболевания, травмы, химического токсического действия и т.п. Фиброз может развиваться во множестве различных тканей и органов, в том числе печени, почке, кишечнике, легком, сердце и т.д.

Как используется в данном документе, "холестатическое состояние" относится к любому заболеванию или состоянию, при котором ухудшается или блокируется выведение желчи из печени, что может иметь место в печени либо в желчных протоках. Внутрипеченочный холестаз и внепеченочный холестаз представляют собой два типа холестатических состояний. Внутрипеченочный холестаз (который имеет место внутри печени) наиболее часто наблюдается при первичном билиарном циррозе, первичном склерозирующем холангите, сепсисе (генерализованной инфекции), остром алкогольном гепатите, токсическом воздействии лекарственных средств, полном парентеральном питании (подаваемом внутривенно), злокачественном новообразовании, муковисцидозе, билиарной атрезии и беременности. Внепеченочный холестаз (который имеет место вне печени) может быть вызван опухолями, сужением каналов, кистами, дивертикулами желчных протоков, образованием камней в общем желчевыносящем протоке, панкреатитом, опухолью или псевдокистой поджелудочной железы и сдавливанием вследствие наличия объемного образования или опухоли в близлежащем органе.

Клинические симптомы и признаки холестатического состояния включают: чесотку (зуд), утомляемость, желтушные кожу или глаза, неспособность к перевариванию некоторых видов пищи, тошноту, рвоту, бледный стул, темную мочу и боль в животе в области правого верхнего квадранта. В отношении пациента с холестатическим состоянием можно проводить диагностику и осуществлять последующее наблюдение в клинических условиях с использованием набора стандартных клинических лабораторных тестов, в том числе измерения уровней щелочной фосфатазы, γ -глутамилтранспептидазы (GGT), 5'-нуклеотидазы, билирубина, желчных кислот и холестерина в сыворотке крови пациента. Как правило, у пациента диагностируют наличие холестатического состояния в случае, если уровни всех трех диагностических маркеров, щелочной фосфатазы, GGT и 5'-нуклеотидазы, в сыворотке крови считаются аномально повышенными. Нормальный уровень этих маркеров в сыворотке крови может в некоторой степени варьироваться среди различных лабораторий и среди различных процедур в зависимости от протокола испытаний. Таким образом, врач будет способен определить с учетом конкретной лаборатории и процедуры тестирования, каким является аномально повышенный уровень в крови для каждого из маркеров. Например, пациент, страдающий от холестатического состояния, как правило, имеет более чем приблизительно 125 МЕ/л щелочной фосфатазы, более чем приблизительно 65 МЕ/л GGT и более чем приблизительно 17 МЕ/л 5'-нуклеотидазы в крови. Ввиду вариабельности уровня маркеров в сыворотке крови холестатическое состояние можно диагностировать на основании аномальных уровней этих трех маркеров в дополнение по меньшей мере к одному из симптомов, упомянутых выше, таких как чесотка (зуд).

Термин "первичный билиарный цирроз", часто сокращаемый как PBC, представляет собой аутоиммунное заболевание печени, для которого характерно медленно прогрессирующее разрушение малых желчных протоков печени при поражении внутридольковых протоков (канальцев Геринга) на ранней стадии заболевания. Если эти протоки поражены, то желчь скапливается в печени (холестаз) и с течением времени приводит к поражению ткани. Это может приводить к рубцеванию, фиброзу и циррозу. Первичный билиарный цирроз характеризуется разрушением междольковых желчных протоков. Гистопатологические наблюдения первичного билиарного цироза включают: воспаление желчных протоков, характеризующееся наличием интраэпителиальных лимфоцитов, и периудактальные эпителиоидные множественные гранулемы. Существует 4 стадии PBC.

Стадия 1 - портальная стадия. Триады нормально размера; портальное воспаление, незначительное поражение желчных протоков. На этой стадии часто выявляются гранулемы.

Стадия 2 - перипортальная стадия. Увеличенные триады; перипортальный фиброз и/или воспаление. Как правило, эта стадия характеризуется наблюдением пролиферации малых желчных протоков.

Стадия 3 - стадия перегородок. Активные и/или пассивные фиброзные перегородки.

Стадия 4 - билиарный цирроз. Присутствуют узелки в виде гирлянд.

Термин "первичный склерозирующий холангит" (PSC) представляет собой заболевание желчных протоков, которое вызывает воспаление и последующее нарушение проходимости желчных протоков как на внутрипеченочном (внутри печени), так и на внепеченочном (вне печени) уровне. Воспаление препятствует потоку желчи в кишечник, что в конечном итоге может привести к циррозу печени, печеночной недостаточности и раку печени.

Термин "неалкогольный стеатогепатит" (NASH) представляет собой воспаление печени, вызванное скоплением жира в печени. У некоторых людей скопление жира вызывает воспаление печени. Вследствие воспаления печень не функционирует так хорошо, как должна. NASH может усугубиться и вызвать рубцевание печени, что приводит к циррозу. NASH аналогичен виду заболевания печени, вызываемому длительным тяжелым пьянством. Однако NASH имеет место у людей, которые не злоупотребляют алкоголем.

Термин "орган" относится к дифференцированной структуре (как в сердце, легком, почке, печени и т.д.), состоящей из клеток и тканей и выполняющей некоторую определенную функцию в организме. Этот термин также охватывает части тела, выполняющие функцию или взаимодействующие в деятельности (например, глаз и связанные с ним структуры, которые образуют органы зрения). Термин "орган" дополнительно охватывает любую частичную структуру из дифференцированных клеток и тканей, которая потенциально способна развиться в полную структуру (например, долю или срез печени).

Все публикации и патентные документы, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предполагает признание того, что любой из них имеет отношение к предшествующему уровню техники, а также не составляет какое-либо признание в отношении их содержания или даты публикации. После того как настоящее изобретение было описано здесь посредством письменного описания, специалистам в данной области будет понятно, что настоящее изобретение может быть осуществлено на практике во множестве вариантов осуществления и что описание и примеры, представленные в данном документе, предназначены для иллюстрации, а не для ограничения следующей формулы изобретения.

В настоящем описании формы единственного числа также включают формы множественного числа, если в контексте четко не указано иное. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В случае противоречий настоящее описание будет иметь преимущественную силу. Все процентные содержания и соотношения, применяемые в данном документе, если не указано иное, приведены по весу.

Примеры

Пример 1. Модель лигирования желчного протока (BDL).

Этот эксперимент осуществляли для оценивания эффектов ОСА и аторвастатина в отдельности и в комбинации в отношении фиброза, индуцированного лигированием общего желчного протока у мышей.

Животные, условия содержания и рацион

Самцов мышей C57BL/6 (в возрасте 6 недель) получали от Japan SLC. Животных содержали в специальном помещении при отсутствии патогенов в контролируемых условиях температуры ($23\pm2^{\circ}\text{C}$), влажности ($45\pm10\%$), освещения (12-часовые циклы искусственного света и темноты; свет с 8:00 до 20:00) и воздухообмена (кратность воздухообмена: более 40 раз/ч). В экспериментальной комнате поддерживали высокое давление (20 ± 4 Па) для предотвращения загрязнения помещения. Животных содержали в KN-600 (Natsume Seisakusho, Япония) не более 6 мышей в каждой клетке. В качестве подстилки применяли стерилизованный Paper-Clean (Japan SLC), который заменяли один раз в неделю. В течение 3 недель перед днем хирургической операции в неограниченном количестве предоставляли стерилизован-

ный твердый рацион с высоким содержанием жиров (HFD) и воду.

Группы обработки

Группа 1: имитация.

Мышам с имитацией операции ($n=8$) перорально вводили среду (0,5% СМС) в объеме 5 мл/кг один раз в день с дня 0 по день 6 после хирургической операции BDL.

Группа 2: BDL-среда.

Мышам после операции BDL ($n=12$) перорально вводили среду (0,5% СМС) в объеме 5 мл/кг один раз в день с дня 0 по день 6 после хирургической операции BDL.

Группа 3: BDL-OCA.

Мышам после операции BDL ($n=12$) перорально вводили среду, дополненную ОСА в дозе 5 мг/кг, один раз в день с дня 0 по день 6 после хирургической операции BDL.

Группа 4: BDL-аторвастатин.

Мышам после операции BDL ($n=12$) перорально вводили среду, дополненную аторвастатином в дозе 10 мг/кг, один раз в день с дня 0 по день 6 после хирургической операции BDL.

Группа 5: OCA-BDL-аторвастатин.

Мышам после операции BDL ($n=12$) перорально вводили среду, дополненную ОСА в дозе 5 мг/кг и аторвастатином в дозе 10 мг/кг, один раз в день с дня 0 по день 6 после хирургической операции BDL.

Хирургическая операция лигирования желчного протока

Хирургическую операцию лигирования желчного протока осуществляли в день 0. Холестаз, который с течением времени приводит к фиброзу печени, формировали у мышей путем лигирования общего желчного протока в условиях анестезии пентобарбиталом. Мышей делили на две операционные группы на основании их веса перед днем хирургической операции. После сбивания шерсти вскрывали брюшную полость, дважды лигировали общий желчный проток с помощью хирургического шелка 5-0 и между лигатурами разрезали общий желчный проток. Брюшную полость и кожу закрывали с помощью швов. Мышей переносили в чистую клетку (клетку для отдыха) для восстановления после анестезии. Мышей с имитацией оперировали аналогично другим группам, но желчный проток не лигировали.

Мониторинг и умерщвление животных

Ежедневно отслеживали жизнеспособность, клинические признаки и поведение. В течение периода обработки ежедневно регистрировали вес тела. В течение периода обработки два раза в неделю измеряли потребление пищи на клетку. В день 6 животных умерщвляли путем кровопускания посредством прямой пункции сердца в условиях эфирной анестезии (Wako Pure Chemical Industries).

Гистологический анализ

Для визуализации отложения коллагена срезы левых латеральных секторов печени, фиксированные в жидкости Буэна, окрашивали с помощью раствора пикросириуса красного (Waldeck, Германия). Для количественного анализа области фиброза с помощью цифрового фотоаппарата (DFC295; Leica, Германия) при 100-кратном увеличении захватывали светлопольные изображения срезов, окрашенных сириусом красным, вокруг центральной вены, и положительные области в 5 полях/срез измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ (Национальный институт здоровья, США). Статистические анализы осуществляли с помощью программного обеспечения Prism 6 (GraphPad Software, Inc., США).

Результаты

Гистопатологические анализы осуществляли на срезах печени (согласно стандартным способам) посредством окрашивания сириусом красным для определения процентной величины области фиброза.

Иллюстративные микрофотографии срезов печени, окрашенных сириусом красным, показаны на фиг. 1A-1E. Группа BDL-среда продемонстрировала значительное увеличение области, положительной по сириусу красному, по сравнению с группой с имитацией BDL. Как указано в табл. 1 и на фиг. 2, группа BDL-OCA+аторвастатин продемонстрировала значительное уменьшение области, положительной по сириусу красному, по сравнению с группой BDL-среда.

Таблица 1

| Параметр (среднее значение \pm SD) | Имитация (n=8) | BDL-среда (n=11) | BDL-OCA (n=12) | BDL-ATO (n=12) | BDL- OCA+ATO (n=12) |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--|
| Область, положительная по сириусу красному (%) | 1,30 \pm 0,45 | 2,17 \pm 0,43 | 2,06 \pm 0,37 | 2,31 \pm 0,63 | 1,60 \pm 0,44 ($p <$ 0,05) |

Результаты в табл. 1 указывают, что комбинация ОСА и аторвастатина значительно снижала интен-

сивность проявлений фиброза.

Пример 2. NASH, индуцированный рационом, у мышей APOE*3Leiden.CETP.

Этот эксперимент осуществляли для оценивания эффектов ОСА и фенофибрата в отдельности и в комбинации в отношении развития NASH и фиброза печени, индуцированных рационом, у трансгенных мышей APOE*3Leiden.CETP. Определение профиля экспрессии генов печени и последующий анализ метаболических путей осуществляли, чтобы определить, регулирует ли комбинация новые гены, не регулируемые любым из монотерапевтических средств лечения, и/или регулирует ли она более сильно гены, на которые также влияет монотерапия.

Животные, условия содержания и рацион

Получали самцов трансгенных мышей APOE*3Leiden.CETP (в возрасте 9-21 недели) и содержали по 2-5 мышей в клетке. Мышам давали рацион с высоким содержанием жиров, содержащий 24% свиного жира и 1% (вес./вес.) холестерина. Вводный период составлял 15 недель на рационе с высоким содержанием жиров. В неделю 16 мышам распределяли на основании возраста, веса тела, уровня холестерина и триглицеридов в плазме крови после 4 ч голодания.

Группы обработки

Группа 1: эталонная группа, получавшая HFC перед началом обработки.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров в течение вводного периода в неделю 0-14.

Группа 2: контрольная группа, получавшая HFC.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров в недели 0-24.

Группа 3: HFC+ОСА.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров, дополненный ОСА в дозе 10 мг/кг один раз в день, в недели 16-24.

Группа 4: HFC+низкодозовый фенофибрат.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров, дополненный фенофибратором в дозе 10 мг/кг один раз в день, в недели 16-24.

Группа 5: HFC+высокодозовый фенофибрат.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров, дополненный фенофибратором в дозе 40 мг/кг один раз в день в недели 16-24.

Группа 6: HFC+ОСА+низкодозовый фенофибрат.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров, дополненный ОСА в дозе 10 мг/кг один раз в день и фенофибратором в дозе 10 мг/кг один раз в день, в недели 16-24.

Группа 7: HFC+ОСА+высокодозовый фенофибрат.

Мышам (n=15) давали рацион с высоким содержанием жиров, дополненный ОСА в дозе 10 мг/кг один раз в день и фенофибратором в дозе 40 мг/кг один раз в день, в недели 16-24.

Группа 8: контрольная группа, получавшая корм.

Мышам (n=8) давали корм в недели 0-24.

План исследования

Мышам давали рацион на основе корма с высоким содержанием жиров (HFC) в течение 14 недель. Через 15 недель на рационе на основе HFC мышей на HFC распределяли по 7 группам на основании возраста, веса тела, уровня холестерина и триглицеридов в плазме крови после 4 ч голодания. Мышей обрабатывали ОСА и фенофибратором в отдельности или в комбинации, начиная с недели 15, и умерщвляли в неделю 25 в состоянии ненатощак. За одну неделю до умерщвления мышей метили с помощью D₂O посредством i.p. инъекции болюсной дозы D₂O и последующего добавления 4% D₂O в питьевую воду. Плазму крови (EDTA) получали посредством пункции сердца и хранили при -70°C. Печень взвешивали и отделяли 4 фрагмента печени: 1 фрагмент (из средней доли) фиксировали в 10% формалине (для гистологического анализа NASH и фиброза) и 3 фрагмента (из левой доли) мгновенно замораживали в жидким N₂ и хранили по отдельности при -70°C.

Балльная оценка воспаления печени

Воспаление является ключевым признаком NASH. Воспаление классифицировали в соответствии с процедурой по Liang et al., PlosOne 2014 Dec, 9(12) и оценивали в баллах посредством количественного анализа количества скоплений воспалительных клеток. В частности, уровень воспаления оценивали посредством подсчета количества очагов воспаления на поле с применением увеличения 100× (размер поля зрения 3,1 мм², среднее значение для пяти разных полей).

Результаты. Краткое описание эффектов комбинации ОСА +/-фенофибратор в отношении воспаления у мышей APOE*3-Leiden.CETP

Исследовали эффекты 10 мг/кг ОСА в отдельности и в комбинации с фенофибратором (10 и 40 мг/кг) в отношении воспаления у мышей APOE*3-Leiden.CETP на рационе, способствующем развитию NASH. После 10 недель введения лекарственного средства при низкой дозе ни ОСА (10 мг/кг), ни фенофибратор (10 мг/кг) не обеспечивали снижение количества очагов с воспалительными клетками (фиг. 3A и B и табл. 2). Напротив, данная комбинация обеспечивала значительное уменьшение воспаления по сравнению с кон-

трольной группой, получавшей среду, а также с каждой группой монотерапии. Более высокая доза фенофибрата (40 мг/кг/день) также обеспечивала значительное снижение интенсивности воспаления по сравнению с представителями контрольной группы, получавшими среду. В комбинации с ОСА никаких дополнительных противовоспалительных эффектов не наблюдалось, так как высокая доза фенофибрата сама по себе оказывала эффект, близкий к максимальному. Таким образом, при использовании комбинации ОСА+низкодозовый фенофибрат наблюдалось значительное снижение интенсивности воспаления (-63%). Кроме того, наблюдалось значительное снижение интенсивности при использовании высокодозового фенофибрата (-74%) и сходное снижение интенсивности при использовании комбинации с ОСА (-79%). См. табл. 2 и фиг. 3A и B.

Таблица 2

| Группа | Воспаление (№ очагов с воспалительными клетками) |
|---|---|
| Группа 1: эталонная группа, получавшая НФС | 24, 3±17, 3 |
| Группа 2: контрольная группа, получавшая НФС | 27, 5±18, 0 (n=15) |
| Группа 3: ОСА | 29, 1±22, 7 |
| Группа 4: низкодозовый фенофибрат | 22, 0±15, 6 |
| Группа 5: высокодозовый фенофибрат | 7, 1±5, 9 |
| Группа 6: ОСА+низкодозовый фенофибрат | 10, 0±7, 0 |
| Группа 7: ОСА+высокодозовый фенофибрат | 5, 1±7, 0 |
| Группа 8: контрольная группа, получавшая корм | 0, 8±0, 4 |

Результаты в табл. 2 позволяют предположить, что эффективность комбинации ОСА и высокой дозы фенофибрата обусловлена высокой дозой фенофибрата и достигает верхнего предела за счет.

Выделение и секвенирование РНК

Экстракцию нуклеиновых кислот осуществляли, как подробно описано ранее (Verschuren et al., 2014). Вкратце, общую РНК экстрагировали из отдельных образцов печени с помощью стеклянных гранул и RNAAzol (Campro Scientific, Венендал, Нидерланды). Концентрацию и качество РНК определяли с помощью Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, США), а также набора RNA 6000 Nano для лаборатории на чипе и Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Амстервен, Нидерланды). Все образцы соответствовали требованиям к качеству и применялись в процедуре секвенирования РНК.

Для обработки образцов применяли набор для получения направленных библиотек РНК NEBNext Ultra для Illumina. Получение образца осуществляли в соответствии с протоколом "NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina" (NEB № E7420S/L). Вкратце, мРНК выделяли из общей РНК с применением магнитных гранул с олиго-dT. После фрагментации мРНК осуществляли синтез кДНК. Это применяли для лигирования адаптеров для секвенирования и ПЦР-амплификации полученного продукта. Качество и выход после получения образца измеряли с помощью Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, США). Размер полученных продуктов соответствовал ожидаемому распределению по размеру (широкий пик от 300 до 500 п.о.).

Кластеризацию и секвенирование ДНК с применением Illumina NextSeq 2500 осуществляли согласно протоколам производителя. Данные генерировали с применением протокола секвенирования по принципу одноконцевого чтения с получением приблизительно 15 млн ридов на образец и 75 п.о. на рид. Анализ изображений, распознавание оснований и проверку качества осуществляли с помощью конвейера для анализа данных RTA V2.4.11 для Illumina для генерирования первичных данных (файлов *.fastq).

Риды картировали на эталонную последовательность GRCm38.p3 Mus musculus с помощью выравнивателя коротких ридов на основе преобразования Барроуза-Уилера. Использовали показатель несовпадения по умолчанию, равный 2% (3 несовпадения на рид из 150 п.о.). На основании местоположений картированных ридов в файлах выравнивания (файлах *.bam) была определена частота того, как часто

рид картировался на транскрипт. Результаты подсчета сохраняли в файлах подсчета, которые служили в качестве исходных данных для последующего анализа дифференциальной экспрессии посредством секвенирования мРНК. Результаты подсчета для рядов загружали в пакет DESeq, пакет программ обработки статистических данных на платформе R. DESeq был специально разработан для нормализации данных секвенирования РНК для разных образцов и поиска дифференциальную экспрессируемым генов среди двух состояний по данным секвенирования РНК для оценки взаимосвязи между средним значением и дисперсией для каждого гена (Anders et al., 2013). Кроме того, он позволяет легко включать коэффициенты масштабирования в статистический тест. Дифференциальную экспрессируемым гены идентифицировали с применением порога значимости $P < 0,01$ и гены применяли в качестве исходных данных для анализа метаболических путей посредством пакета программ Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (доступного по состоянию на 2016 г.).

Анализ вышерасположенных регуляторов осуществляли с помощью программного обеспечения IPA (Kramer et al., 2014). В этом анализе определяют состояние активации факторов транскрипции на основании наблюдаемой дифференциальной экспрессии генов. В результате этого получают P-значение перекрывания и z-оценку активации по каждому фактору транскрипции в информационной базе данных IPA. P-значение перекрывания указывает на значимость перекрывания между известными целевыми генами факторов транскрипции и дифференциальную экспрессируемыми генами, подвергаемыми измерениям в эксперименте. Z-оценка активации указывает на активацию (положительная z-оценка) или ингибирование (отрицательная z-оценка) определенного фактора транскрипции. Z-оценка активации <-2 или >2 указывает на значимое ингибирование или активацию метаболического пути или процесса.

Результаты применения омик

Секвенирование нового поколения осуществляли на образцах мРНК печени обработанных мышей для получения представления о лежащих в основе механизмах и метаболических путях. Два анализа осуществляли для получения представления о лежащих в основе механизмах и метаболических путях.

Во-первых, анализ представленности канонических метаболических путей выявил, что ОСА регулировала несколько воспалительных процессов (фиг. 6А). На фигуре графически представлен каждый метаболический путь в зависимости от $-\log p$ -значения (для справки, преобразованное значение для $p < 0,05$ составляет 1,3, для $p < 0,0001$ составляет 4, для $p < 0,000005$ составляет 5,3 и т.д.). Метаболические пути, регулируемые ОСА в режиме монотерапии, были связаны с передачей сигнала в Т- и В-клетках, передачей сигнала, активирующего экстравазацию лейкоцитов, передачей сигнала в естественных клетках-киллеров и т.д. Низкая доза фенофибрата не оказывает эффект в отношении этих метаболических путей. В тех случаях, когда ОСА комбинировали с низкой дозой фенофибрата, для некоторых из тех же метаболических путей наблюдалась сильная регуляция (в случае передачи сигнала с помощью iCOS-iCOSL в Т-клетках-хеллерах, передачи сигнала, активирующей экстравазацию лейкоцитов, паттерн-распознающих рецепторов, фагоцитоза, опосредованного Fc-рецепторами, в макрофагах и образования фагосом). Кроме того, другие метаболические пути (например, I и II пути биосинтеза холестерина, β -окисление жирных кислот), регуляция которых любым из средств в отдельности была незначительной, регулировались комбинацией (фиг. 6В). Как и в случае с гистологическими данными, высокая доза фенофибрата оказывала устойчивый эффект в отношении этих метаболических путей, который, однако, не усиливался при совместном введении с ОСА.

Более подробный анализ осуществляли в отношении метаболических путей, участвующих в передаче сигнала, активирующего экстравазацию лейкоцитов. Экстравазация лейкоцитов имеет существенное значение в патофизиологических процессах при NASH (и других заболеваниях). Эти процессы включают миграцию Т-лимфоцитов для иммунного надзора, привлечение активированных лимфоцитов и гранулоцитов во время острых и хронических воспалительных реакций, а также хоминг и мобилизацию гемопоэтических клеток-предшественников. Эффекты выдерживания мышей на рационе с высоким содержанием жиров из исследования иллюстрируют эти процессы, при которых наблюдается значительное повышение и снижение экспрессии генов. В табл. 3 описаны эффекты рациона с высоким содержанием жиров в отношении передачи сигнала, активирующего экстравазацию лейкоцитов, у мышей, выдерживаемых на рационе с высоким содержанием жиров, по сравнению с мышами, выдерживаемыми на стандартном корме, а также эффекты комбинированной обработки по сравнению с рационом с высоким содержанием жиров.

Таблица 3

| Ген | Полное (полные) название (названия) | Предсказанная функция | Значитель- ная регуляция рационом, способст- вующим развитию NASH, по сравнению с кормом | Значитель- ная регуляция комбина- цией по сравнению с рационом, способст- вующим развитию NASH |
|------|--|---|---|---|
| CD43 | Кластер дифферени- ровки 43, или лейкосиалин | Основной сиалогликопротеин, расположенный на поверхности Т- лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и некоторых В- лимфоцитов | ↑ | ↓ |
| CD44 | Кластер дифференци- ровки 44 | Гликопротеин клеточной поверхности, участвующий в межклеточных взаимодействиях, адгезии и миграции клеток | ↑ | ↓ |

036404

| | | | | |
|--------|---|--|---|---|
| CDH5 | Кадгерин 5, или CD144 | Придает клеткам способность к гомофильтному прилипанию и контролирует сцепление и организацию межклеточных контактов | ↑ | ↔ |
| CRK | Регулятор киназы СТ10, или p38 | Адаптерный белок во внутриклеточных сигнальных путях | ↓ | ↔ |
| CXCR4 | Рецептор 4 хемокинов с мотивом С-Х-С, или CD184 | Рецептор для хемотаксической активности в отношении лимфоцитов | ↑ | ↓ |
| ERM | Семейство белков эзрин/радиксин/моэзин | Сшивает актиновые филаменты с плазматическими мембранами | ↓ | ↓ |
| EPAC | Белок обмена, активируемый cAMP | Внутриклеточные сенсоры для cAMP | ↓ | ↔ |
| ICAM-1 | Внутриклеточная молекула адгезии 1, или CD54 | Гликопротеин клеточной поверхности, который связывает интегрины | ↑ | ↓ |
| ITGA4 | Альфа-субъединица интегрина | Большая субъединица хоминг-рецептора лимфоцитов a4b1 | ↑ | ↓ |

| | | | | |
|-------|---|--|---|---|
| ITGAL | Интегрин альфа-L, или CD11A | Адгезия клеток и передача костимулирующего сигнала | ↑ | ↓ |
| ITGAM | Интегрин альфа M, или CD11B | Регулирует адгезию и миграцию лейкоцитов | ↑ | ↓ |
| ITGB1 | Интегрин бета-1, или CD29 | Интегрины участвуют в адгезии клеток и передаче сигналов, опосредованной рецепторами клеточной поверхности | ↓ | ↔ |
| ITGB2 | Интегрин бета-2, или CD18 | Интегрины участвуют в адгезии клеток и передаче сигналов, опосредованной рецепторами клеточной поверхности | ↑ | ↓ |
| JAM2 | Молекула адгезионных контактов 2, или CD322 | Адгезивный лиганд для взаимодействия с множеством типов иммунных клеток и хоминга лимфоцитов | ↑ | ↔ |
| JAM3 | Молекула адгезионных контактов 3 | Связывается с JAM2 при регулировании адгезии | ↓ | ↔ |

| | | | | |
|--------|--|--|---|---|
| LFA-1 | Функционально-связанный антиген лимфоцитов 1 | Молекула адгезии на Т-клетках, В-клетках, макрофагах и нейтрофилах | ↔ | ↓ |
| NCF1 | Цитозольный фактор нейтрофилов 1 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | ↑ | ↓ |
| NCF2 | Цитозольный фактор нейтрофилов 2 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | ↑ | ↓ |
| NCF4 | Цитозольный фактор нейтрофилов 4 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | ↑ | ↓ |
| NOX | NADPH-оксидаза | Ферменты, которые транспортируют электроны через плазматическую мембрану и обеспечивают образование супероксидов и нижерасположенных активных форм кислорода | ↑ | ↓ |
| PECAM1 | Молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток, или CD31 | Трансмиграция лейкоцитов, ангиогенез и активация интегринов | ↑ | ↔ |

| | | | | |
|--------|---------------------------------------|--|---|---|
| PKC | Протеин-киназа С | Член семейства ферментов, контролирующих фосфорилирование аминокислот серина и треонина в других белках | ↔ | ↔ |
| PI3K | PI3-киназы | PI3K представляют собой семейство родственных ферментов, являющихся внутриклеточными переносчиками сигнала | ↔ | ↓ |
| PLC | Фосфолипаза С | Катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата | ↔ | ↓ |
| PSGL-1 | Гликопротеиновый лиганд 1 P-селектина | Роль в перемещении лейкоцитов в ходе воспаления путем фиксации лейкоцитов на активированных тромбоцитах или эндотелии, экспрессирующем селектины | ↑ | ↓ |

| | | | | |
|----------|---|--|---|---|
| Rac2 | Родственный Ras субстрат ботуло-токсина C3 | Регулирует различные клеточные события, включая рост, реорганизацию цитоскелета и активацию протеинкиназ | ↑ | ↓ |
| RASGRP 1 | Белок, высвобождающий гуаниловые нуклеотиды RAS | Активирует Erk/MAP-киназный каскад и регулирует развитие, гомеостаз и дифференцировку Т- и В-клеток | ↑ | ↓ |
| RhoH | Ген-гомолог H Ras | Регулирует внутриклеточную динамику актина | ↑ | ↓ |
| RhoGAP | ГТФазы RHO | Белковый домен белков, активирующих ГТФазы | ↔ | ↓ |
| SPA-1 | Белок 1, связанный с пролиферацией, индуцированной сигналом | Может препятствовать прогрессии клеточного цикла, индуцированной митогенами, при аномальной экспрессии | ↑ | ↔ |

| | | | | |
|-------|--|---|---|---|
| THY-1 | Дифференцировочный антиген тимоцитов 1, или CD90 | Межклеточные взаимодействия и взаимодействия между клетками и матриксом, может влиять на разрастание нейритов, регенерацию нервов, апоптоз, метастазирование, воспаление и фиброз | ↑ | ↓ |
| TIMP | Тканевой ингибитор металло-протеиназ | Связывает и инактивирует тканевые металлопротеиназы | ↔ | ↓ |
| VASP | Фосфопротеин, стимулируемый вазодилататором | Участвует во внутриклеточных сигнальных путях, которые регулируют взаимодействия между интегринами и внеклеточным матриксом | ↑ | ↓ |
| VAV | VAV | Протоонкоген, опосредующий активацию B-лимфоцитов, индуцируемую антигеном | ↑ | ↓ |
| VCAM1 | Белок 1 адгезии клеток сосудов, или CD106 | Адгезия лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов к эндотелию сосудов | ↑ | ↓ |
| WASP | Белок синдрома Вискотта-Олдрича | Важный для подвижности лейкоцитов <i>in vivo</i> | ↔ | ↓ |

Трансмиграция и экстравазация лейкоцитов через эндотелий происходит посредством нескольких отдельных стадий, включающих перекатывание лейкоцитов через эндотелиальные клетки, опосредованное неустойчивыми слабыми взаимодействиями между молекулами адгезии. В результате этого лейкоциты находятся в такой непосредственной близости от эндотелия, что они активируются хемотаксическими цитокинами, присутствующими на апикальной поверхности эндотелия. Затем активированные лейкоциты распространяются и плотно прилипают к эндотелию, образующему стыковочные структуры, и в конечном итоге мигрируют через межклеточные щели между эндотелиальными клетками в нижележащие ткани.

жащую ткань.

Введение ОСА снижает экспрессию многочисленных генов, участвующих в протекании этого каскада воспаления в лейкоцитах (WAP, Rac2, RASGRP1, Vav, PKC, PI3K, ERM, ITGAL и PSGL-1), а также в эндотелиальных клетках (VCAM1, PI3K, ERM, NOX, CYBA, PKC, NCF1 и 2). Регуляция генов в этих метаболических путях не была выраженной после введения низкой дозы фенофибрата в отдельности.

При комбинировании ОСА с дозой фенофибрата, которая была неэффективной в регулировании этих метаболических путей, теперь регулировались несколько дополнительных генов, что указывало на синергический эффект. В лейкоцитах эти дополнительные гены включали CD43, PSGL-1, CXCR4, ITGAM, ITGB2, Rap1, ITGA4. В эндотелиальных клетках эти дополнительные гены включали ICAM1, RhoGAP, VASP, NCF4, ITGAM, ITGB2, ITGA4 и ICAM-1.

Как отмечалось выше, высокая доза фенофибрата оказывала многочисленные эффекты в отношении данного метаболического пути, которые не усиливались при совместном введении с ОСА. Во всех последующих анализах внимание было сосредоточено на низкодозовых монотерапевтических средствах и комбинации (ОСА 10 мг/кг +/- фенофибрат 10 мг/кг).

В втором анализе сравнивали гены, дифференциаль но регулируемые низкодозовой комбинацией и каждым соответствующим монотерапевтическим средством. Он отличается от первых анализов экспрессии генов (описанных выше), в которых внимание сосредоточено на сравнениях относительно группы, получавшей среду; в анализе ниже каждое монотерапевтическое средство сравнивается с комбинацией. На диаграмме Венна (фиг. 7А) показано, что ОСА регулировала 109 уникальных генов, фенофибрат регулировал 92 уникальных гена и 6 генов регулировались ими совместно. Комбинация регулировала 517 генов, перекрывающихся с ОСА, 75 генов, перекрывающихся с фенофибратором, и 5 генов регулировались совместно всеми из них. Следует отметить, что комбинация регулировала в общей сложности 912 уникальных генов. На последующей картине представленности метаболических путей отмечены биологические процессы, в которых участвуют гены, регулируемые комбинацией (фиг. 7В).

Последующие анализы метаболических путей проводили в обоих случаях в отношении экстравазации лейкоцитов (например, как указано выше), но на этот раз сравнения проводили между комбинацией и каждым монотерапевтическим средством. В отношении экстравазации лейкоцитов сравнения комбинации с каждым монотерапевтическим средством выявили наличие ряда уникально регулируемых генов, что соответствовало наблюдаемым усиленным противовоспалительным изменениям, отмеченным путем гистологического анализа у мышей, обработанных комбинацией (табл. 4).

Таблица 4

| Ген | Полное (полные) название (названия) | Предсказанная функция | Комбинация по сравнению с фенофибратором в режиме монотерапии | Комбинация по сравнению с ОСА в режиме монотерапии |
|-----|-------------------------------------|-----------------------|---|--|
| | | | | |

| | | | | |
|--------|---|---|---|---|
| CD44 | Кластер дифференцировки 44 | Гликопротеин клеточной поверхности, участвующий в межклеточных взаимодействиях, адгезии и миграции клеток | | ↓ |
| CXCR4 | Рецептор 4 хемокинов с мотивом С-Х-С, или CD184 | Рецептор для хемотаксической активности в отношении лимфоцитов | | ↓ |
| CYBA1 | Цитохром b (-245) | Кодирует легкую цепь цитохрома b (-245), который является компонентом комплекса NOX | | ↓ |
| ERM | Семейство белков эзрин/радиксин/моэзин | Сшивает актиновые филаменты с плазматическими мембранами | | ↓ |
| ICAM-1 | Внутриклеточная молекула адгезии 1, или CD54 | Гликопротеин клеточной поверхности, который связывает интегрины | ↓ | ↓ |
| ITGA4 | Альфа-субъединица интегрина | Большая субъединица хоминг-рецептора лимфоцитов а4b1 | ↓ | ↓ |

| | | | | |
|-------|--|--|---|---|
| ITGAL | Интегрин альфа-L, или CD11A | Адгезия клеток и передача костимулирующего сигнала | | ↓ |
| ITGAM | Интегрин альфа-M, или CD11B | Регулирует адгезию и миграцию лейкоцитов | | ↓ |
| ITGB2 | Интегрин бета-2, или CD18 | Интегрины участвуют в адгезии клеток и передаче сигналов, опосредованной рецепторами клеточной поверхности | ↓ | ↓ |
| LFA-1 | Функционально-связанный антиген лимфоцитов 1 | Молекула адгезии на Т-клетках, В-клетках, макрофагах и нейтрофилах | ↓ | ↓ |
| MMP9 | Матриксная металло-протеиназа 9 | Разрушает коллаген внеклеточного матрикса | | ↓ |
| NCF1 | Цитозольный фактор нейтрофилов 1 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | | ↓ |
| NCF2 | Цитозольный фактор нейтрофилов 2 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | | ↓ |
| NCF4 | Цитозольный фактор нейтрофилов 4 | Субъединица NADPH-оксидазы нейтрофилов | | ↓ |

| | | | | |
|--------------|-----------------|--|---|---|
| NOX | NADPH-оксидаза | Ферменты, которые транспортируют электроны через плазматическую мембрану и обеспечивают образование супероксидов и нижерасположенных активных форм кислорода | | ↓ |
| PKC | Протеинкиназа С | Член семейства ферментов, контролирующих фосфорилирование аминокислот серина и треонина в других белках | | ↓ |
| PI3K | PI3-киназы | PI3K представляют собой семейство родственных ферментов, являющихся внутриклеточными переносчиками сигнала | ↓ | ↓ |
| PLC γ | Фосфолипаза С | Катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата | | ↓ |

| | | | | |
|----------|---|--|---|---|
| PSGL-1 | Гликопротеиновый лиганд 1 Р-селектина | Роль в перемещении лейкоцитов в ходе воспаления путем фиксации лейкоцитов на активированных тромбоцитах или эндотелии, экспрессирующим селектины | ↓ | ↓ |
| Rac2 | Родственный Ras субстрат ботулотоксина C3 | Регулирует различные клеточные события, включая рост, реорганизацию цитоскелета и активацию протеинкиназ | | ↓ |
| Rap1G AP | Белок 1, активирующий ГТФазу RAP1 | RAP1 представляет особый интерес, поскольку он, как было показано, является антагонистом RAS и способен подавлять трансформацию клеток | | ↓ |

| | | | | |
|-------------|--|---|--|---|
| RASGR P1 | Белок, высвобождающий гуаниловые нуклеотиды RAS | Активирует Erk/MAP-киназный каскад и регулирует развитие, гомеостаз и дифференцировку Т- и В-клеток | | ↓ |
| RhoH | Ген-гомолог Н Ras | Регулирует внутриклеточную динамику актина | | ↓ |
| RhoGA P | ГТФазы RHO | Белковый домен белков, активирующих ГТФазы | | ↓ |
| TIMP | Тканевой ингибитор металло- протеиназ | Связывает и инактивирует тканевые металлопротеиназы | | ↓ |
| VASP | Фосфопротеин, стимулируемый вазодилататором | Участвует во внутриклеточных сигнальных путях, которые регулируют взаимодействия между интегринами и внеклеточным матриксом | | ↓ |
| VAV | VAV | Протоонкоген, опосредующий активацию В- лимфоцитов, индуцируемую антигеном | | ↓ |
| VCAM1 | Белок 1 адгезии клеток сосудов, или CD106 | Адгезия лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов к эндотелию сосудов | | ↓ |
| WASP | Белок синдрома Вискотта- Олдричча | Важный для подвижности лейкоцитов <i>in</i> <i>vivo</i> | | ↓ |

С учетом прогрессирования от воспаления до фиброза при NASH и наблюдения того, что метабо-

лические пути, участвующие в развитии фиброза печени, в HSC, как оказывается, подвергаются значительной регуляции со стороны комбинации, авторы настоящего изобретения также изучили метаболические пути в HSC. По сравнению с монотерапией ясно, что комбинация по сравнению с фенофибратором в отдельности регулирует большее количество генов, и комбинация по сравнению с ОСА регулирует меньшее количество генов. Иными словами, в отношении этих метаболических путей, участвующих в развитии фиброза, очевидно взаимодействие между обоими средствами, однако часть комбинации, представляющая собой ОСА, может более сильно управлять этими эффектами.

Пояснение и значимость

Важность активации FXR для предупреждения фиброза и воспаления продемонстрирована на образцах печени мышей, нокаутных по FXR, которые характеризуются повышенной экспрессией воспалительных генов (Kim 2007) с прогрессирующим возрастным повреждением и воспалением (Yang 2007). ОСА проявляет противовоспалительные свойства в клетках HepG2 и первичных гепатоцитах мыши, что соответствует этим сообщениям. Клетки HepG2, предварительно обработанные ОСА, а затем подвергнутые воздействию провоспалительных стимулов, демонстрировали 50-60% снижение уровней мРНК, кодирующей TNF- α , индукции циклооксигеназы-2 (COX-2) и экспрессии индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS), стимулируемой TNF- α . Аналогично первичные гепатоциты, обработанные ОСА, характеризовались ослабленной индукцией (40-50%) экспрессии генов iNOS и моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) в ответ на провоспалительный стимул (Wang 2008). Эффекты ОСА в отношении механизмов миграции клеток непосредственно не изучались, однако ОСА ингибиравала выработку iNOS или COX-2, индуцируемую IL-1 β , и устранила фармакологически индуцированную миграцию клеток гладких мышц аорты крысы (Li 2007). Аналогичное ингибиование образования воспалительных инфильтратов с помощью ОСА было продемонстрировано в ткани кишечника в двух животных моделях воспалительного заболевания кишечника (индуцированного DSS и триниитробензолсульфоновой кислотой) (Gadaleta 2011) и в почке в крысиной модели сахарного диабета 1 типа (Wang 2010). Таким образом, наблюдение усиленных противовоспалительных эффектов ОСА позволяет предположить, что изменения экспрессии генов под воздействием ОСА в комбинации с фенофибратором могут усилить ингибиование воспаления и миграции воспалительных клеток при ряде болезненных состояний.

Пример 3. NASH, индуцированный рационом, у мышей ob/ob с дефицитом лептина.

Этот эксперимент осуществляли для оценивания эффекта 8 недель обработки ОСА и аторвастиатином в отдельности и в комбинации в отношении стадии фиброза (состояние перед биопсией по сравнению с состоянием после биопсии) у самцов мышей ob/ob с дефицитом лептина с NASH.

Животные, условия содержания и рацион

Самцов мышей Lep^{ob}/Lep^{ob} (в возрасте 5 недель) приобретали у JanVier, Франция. Во время периода акклиматизации и индукции рационом мышей содержали в группах по пять на клетку в изготовленных на заказ шкафах с циклом чередования света и темноты 12:12 (свет был включен с 3 ч ночи до 3 ч дня) в контролируемых температурных условиях ($22\pm1^{\circ}\text{C}$; относительная влажность $50\pm10\%$). На протяжении всего периода индукции рационом и исследования у мышей был неограниченный доступ к изготовленному на заказ рациону, способствующему развитию NASH (S8189, Ssniff, Германия) (40% жира, 40% углеводов (20% фруктозы) и 2% холестерина), или обычному корму для грызунов (корму для ob/ob) (Altromin 1324, Brogaarden, Дания) и водопроводной воде. Животных выдерживали на рационе в общей сложности в течение 18 недель перед вмешательством и выдерживали на рационе в течение всего периода исследования. Животных содержали по отдельности во время восстановления после операции и в течение всего периода исследования.

Группы обработки

Группа 1: Lep^{ob}/Lep^{ob}-NASH, среда.

Мышам (n=10) перорально вводили среду (0,5% СМС) в объеме 5 мл/кг один раз в день в недели 0-8.

Группа 2: Lep^{ob}/Lep^{ob}-NASH, ОСА.

Мышам (n=10) перорально вводили среду, дополненную аторвастиатином в дозе 30 мг/кг, один раз в день в недели 0-8.

Группа 3: Lep^{ob}/Lep^{ob}-NASH.

Мышам (n=11) перорально вводили среду, дополненную аторвастиатином в дозе 10 мг/кг, один раз в день в недели 0-8.

Группа 4: Lep^{ob}/Lep^{ob}-NASH, ОСА+аторвастиатин.

Мышам (n=9) перорально вводили среду, дополненную комбинацией ОСА в дозе 30 мг/кг и аторвастиатина в дозе 30 мг/кг, один раз в день.

Распределение в исследования, стратифицированная рандомизация и мониторинг исходного уровня

Через 15 недель индукции рационом (за 3 недели до начала исследования) получали биоптат печени для оценки прогрессирования фиброза и стеатоза в печени, а также для оценивания стадии фиброза печени. В неделю 1 осуществляли стратифицированную рандомизацию в группы обработки в соответствии со стадией фиброза печени, балльной оценкой стеатоза и весом тела.

Процедура перед биопсией

В день операции мышей анестезировали изофлураном (2-3%) в 100% кислороде. Делали небольшой абдоминальный разрез по срединной линии и обнажали левую латеральную долю печени. Конусообразный клиновидный фрагмент ткани печени (~100 мг) отрезали от дистальной части доли, взвешивали и фиксировали в 4% пароформальдегиде (PFA) для гистологического анализа.

Поверхность разреза печени немедленно электрокоагулировали с помощью биполярной коагуляции (аппарат для электрохирургии ERBE VIO 100). Печень возвращали в брюшную полость и брюшную полость зашивали, а кожу закрывали с помощью аппаратов для наложения скобок. В день операции мыши получали теплый солевой раствор (0,5 мл) для регидратации. Для восстановления после операции подкожно вводили карпрофен (5 мг/мл - 0,01 мл/10 г) и энрофлоксацин (5 мг/мл - 1 мл/кг) в день операции и дни 1 и 2 после операции.

Предварительный скрининг для оценки уровня стеатоза и фиброза в печени

Подготовка биоптата печени для гистологической оценки.

После хранения в течение ночи в 4% PFA биоптаты печени пропитывали в течение ночи парафином в автоматическом гистопроцессоре Tissue-TEK VIP от Miles Scientific и затем заливали в парафиновые блоки. В один блок заливали биоптаты от пяти разных животных. Затем блоки подрезали и на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific) отрезали два среза на 3 мкм (один для окрашивания сирином красным и один для окрашивания H&E). Два блока помещали на одно предметное стекло с получением в общей сложности 10 биоптатов на предметное стекло, представляющих 10 разных животных. Срезы оставляли высыхать в течение ночи. Оценивание стадии фиброза для стратификации и рандомизации в группы обработки осуществляли в соответствии с описанным в общих чертах Kleiner et al. (2005) (см. ниже).

Исходные и конечные биомаркеры плазмы крови.

Образцы крови для измерения уровней триглицеридов в плазме крови не натощак (после еды) получали утром (в 7-8 ч утра) в начальный момент и в неделю 8 обработки. Образцы крови собирали из хвостовой вены (путем обрезания) в сознательном состоянии. Последнюю дозу лекарственного средства вводили за ~18 ч до забора образцов крови. После забора образцов крови мышей повторно кормили.

Выведение из эксперимента и вскрытие.

Животных выводили из эксперимента в неделю 8 в состоянии не натощак. Последнюю дозу лекарственного средства вводили за ~18 ч до выведения из эксперимента, и животные не получали дозированное лекарственное средство до выведения из эксперимента. У животных индуцировали анестезию с помощью CO₂/O₂ и во время анестезии (изофлураном) вскрывали брюшную полость и получали сердечную кровь для сбора конечной плазмы крови. При вскрытии цельную печень собирали и взвешивали. Биоптат левой латеральной доли отрезали и фиксировали в 4% PFA для гистологического и биохимического анализа. Среднюю долю разделяли на фрагменты и мгновенно замораживали в жидком азоте для биохимического анализа (TG). Оставшуюся ткань печени затем фиксировали в 4% PFA для последующего необязательного гистологического анализа.

Обработка ткани печени

Биопсия перед исследованием.

Примерно за три недели до начала исследования конусообразный клиновидный фрагмент ткани печени (~100 мг) отрезали от дистальной части левой латеральной доли, взвешивали и немедленно помещали в 4% PFA.

Конечная ткань печени.

После 8 недель обработки цельную печень собирали, взвешивали и биоптат левой латеральной доли печени (~150-200 мг) отрезали и немедленно помещали в 4% PFA. Фрагменты средней доли мгновенно замораживали в криопробирках (для секвенирования РНК) (~100 мг) и в пробирках FastPrep для определения TG (~100 мг) и для определения ТС (~50 мг).

Фиксация, заливка и получение срезов для гистологического анализа.

После фиксации в течение ночи в 4% PFA биоптаты печени пропитывали в течение ночи парафином в автоматическом гистопроцессоре Tissue-TEK VIP от Miles Scientific и затем заливали в парафиновые блоки. В один блок заливали биоптаты от пяти разных животных. Блоки подрезали и на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific) отрезали два среза на 3 мкм на блок. По одному срезу из двух разных блоков помещали на одно предметное стекло с получением в общей сложности 10 биоптатов на предметное стекло, как изложено в общих чертах выше.

Стадия фиброза

Ткань из левой латеральной доли печени перед биопсией и после биопсии собирали для оценки стадии фиброза посредством применения клинических критериев, изложенных в общих чертах Kleiner и соавторами (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, Kleiner et al, Hepatology 41; 2005) и воспроизведенных в табл. 5 ниже. На фиг. 4 описан эффект ОСА и аторвастатина в отдельности и в комбинации в отношении балльной оценки фиброза. Комбинация ОСА и аторвастатина демонстрирует тенденцию к снижению балльной оценки фиброза по сравнению со средой, хотя и незначимому (р-значение=0,09).

Таблица 5

| Признак | Степень | Балльная оценка |
|---------|---|-----------------|
| Фиброз | Отсутствует | 0 |
| | Перисинусоидальный или перипортальный | 1 |
| | Легкий, зона 3, перисинусоидальный | 1А |
| | Умеренный, зона 3, | 1В |
| | перисинусоидальный | |
| | Портальный/ перипортальный | 1С |
| | Перисинусоидальный и портальный/ перипортальный | 2 |
| | Мостовидный фиброз | 3 |
| | Нет | 0 |

Триглицериды в плазме крови

Уровни триглицеридов. 100 мкл крови собирали в пробирки с литий-гепарином. Плазму крови отделяли и образцы хранили при -80°C до анализа. Уровни триглицеридов измеряли посредством однократных определений с использованием автоанализатора Cobas C-111 с помощью коммерческого набора (Roche Diagnostics, Германия) согласно инструкциям производителя. Как указано на фигурах 5А и В, комбинация ОСА и аторвастатина обеспечивала статистически значимое снижение уровней триглицеридов.

Пример 4. Многослойная культура гепатоцитов.

Этот эксперимент осуществляли для оценивания эффекта ОСА в комбинации с агонистом PPAR или статином для определения их способности к изменению синтеза коллагена в гепатоцитах человека.

Реагенты и растворы

Подходящая среда для культивирования клеток включает среду Веймаута MB-752/1, среду Хэма F12, RPMI 1640, среду Игла в модификации Дульбекко, среду Вильямса E, среду Лейбовица L15 и модифицированную среду Чи. Коллагеназу IV типа, коллаген I типа, перколл, культуральную среду и добавки, добавляемые в культуральную среду (например, сыворотку крови, антибиотики, аминокислоты, гормоны, такие как DEX, инсулин и факторы роста), буфер для перфузии и другие растворы были коммерчески доступными или полученными из коммерчески доступных материалов. В многослойной культуре гепатоцитов можно применять другие типы коллагена (типы II-IV), ламинин, фибронектин и гепарансульфатсодержащие протеогликаны. Однако было показано, что коллаген I и IV типа превосходил фибронектин и ламинин.

Выделение гепатоцитов

Для выделения гепатоцитов используют двухстадийный способ перфузии коллагеназой *in situ*. Вкратце, гепатоциты выделяют из самок крыс Lewis. Животных анестезируют. Печень вначале перфузируют через воротную вену *in situ* с помощью буфера для перфузии. Перфузат уравновешивают перед поступлением в печень. Затем печень перфузируют коллагеназой в буфере для перфузии. Затем печень разрезают и переносят в ледяной буфер для перфузии. Капсулу печени отделяют и полученную суспензию клеток фильтруют. Клеточный осадок собирают с помощью центрифугирования и ресусцидируют. К суспензии добавляют перколл и гепатоциты отделяют с применением методики центрифугирования в градиенте плотности перколла. Смесь центрифицируют и клеточный осадок дважды промывают средой. Жизнеспособность гепатоцитов определяют по вытеснению трипанового синего. В качестве альтернативы вместо свежевыделенных гепатоцитов можно применять криоконсервированные гепатоциты.

Многослойная культура гепатоцитов

Выделенные гепатоциты культивируют на покрытых коллагеном планшетах для культур тканей и поддерживают в культуральной среде, дополненной сывороткой крови, пенициллином, стрептомицином, эпидермальным фактором роста, инсулином, глюкагоном и гидрокортизоном. Гелеобразующий раствор коллагена получают путем смешивания раствора коллагена I типа и культуральной среды. Планшеты для культур тканей покрывают гелеобразующим раствором и инкубируют при 37°C для обеспечения образования геля. Гепатоциты высевают при надлежащей плотности и поддерживают при 37°C. Культуральную среду заменяют каждые 24 ч.

Для многослойной системы дополнительный гелевый раствор коллагена распределяют по клеткам спустя 1 день культивирования. Культуральную среду осторожно удаляют, чтобы гарантировать равномерное распространение второго слоя коллагенового геля по всему планшету. Культуральные планшеты инкубируют при 37°C для обеспечения гелеобразования и прикрепления второго слоя геля до замены среды. Культуральную среду меняют ежедневно. Образцы среды хранят при -20°C для дополнительного анализа.

Гепатоциты, культивируемые между слоями гелеобразного коллагена, сохраняют трехмерную кубическую форму и распределение белков цитоскелета, подобное наблюдаемому *in vivo*.

Оптимизация образования сети желчных проточек

Для оптимизации накопления таурохолата и выведения желчи в многослойной культуре гепатоцитов можно применять определенную культуральную среду, такую как среда Вильямса Е и среда Игла в модификации Дульбекко.

Тестируемые препараты

Агонист FXR, предназначенный для исследования, представляет собой обетихолевую кислоту, также известную как "ОСА" и 6-этилхенодезоксихолевая кислота (6-ECDCA).

Агонисты PPAR-альфа, предназначенные для исследования, включают один или несколько из клофibrата, гемфиброзила, ципрофибрата, безафибрата и фенофибрата.

Двойной агонист PPAR-альфа/дельта представляет собой 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-1(Е)-пропенил]феноксил]-2-метилпропановую кислоту.

Агонист PPAR δ (дельта), предназначенный для исследования, представляет собой GW501516.

Статины (ингибиторы HMG-CoA-редуктазы), предназначенные для исследования, включают аторвастатин (липitor), розувастатин (крестор) и симвастатин (зокор).

Пример 5. Оценивание эффектов введения тестируемых препаратов по отдельности в отношении липидных профилей.

Оценивают потенциал 5 тестируемых препаратов, агониста FXR, агониста PPAR-альфа, агониста PPAR-дельта, двойного агониста PPAR-альфа/дельта (или, в качестве альтернативы, агониста PPAR-альфа и агониста PPAR-дельта вместе) и статина для определения способности к изменению синтеза холестерина и липидного профиля в гепатоцитах человека. Изменения оценивают в гепатоцитах человека в многослойной культуре (SCHN) после 72 ч воздействия тестируемых препаратов в 3 различных концентрациях. Дозируемые растворы получают свежими ежедневно в культуральной среде, и дозирование в SCHN происходит ежедневно в течение 3 дней. Эксперимент осуществляют в 24-луночном формате с применением одной партии гепатоцитов человека Transporter Certified™ (N=1). Каждое условие тестирования выполняют в трех лунках с получением данных в трех повторностях (выраженных как среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение). Планшеты, обработанные растворителем-контролем, применяют в качестве контроля и оценивают в отношении функции на исходном уровне. В конце периода тестирования в отдельные лунки добавляют внутренний стандарт, после чего добавляют экстракционный реагент для определения глобального липидного профиля. Образцы встряхивают в течение 1 ч при комнатной температуре и центрифугируют. Надосадочную жидкость выпаривают досуха в атмосфере азота, ресусцинируют и анализируют.

Определение глобального липидного профиля осуществляют с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) и MS высокого разрешения. Экстракти образцов, полученные путем экстракции метил-трет-бутиловым эфиром, анализируют на приборе для UPLC-MS (спектрометре ионной подвижности Synapt G2 QToF) в режиме ESI+ и ESI- для охвата широкого диапазона полярности и химического состава липидов. Первоначально UPLC применяют для оценивания эффектов соединений в отношении обширного спектра (5000-8000) липидов, в том числе нескольких сложных эфиров холестерина. Колориметрический анализ осуществляют для измерения общего уровня холестерина. По распространенности большинство являются глицерофосфолипидами, однако оценивают большое количество классов. Профили оценивают для идентификации потенциальных эффектов в отношении отдельных липидов. Идентификацию конкретных липидов можно проводить в сравнении со стандартами с применением времени удерживания в анализе, точной массы и фрагментации. В зависимости от результата можно идентифицировать конкретные липиды или классы липидов для оценивания в примерах 6 и 7. Подтверждающее исследование повторяют с двумя дополнительными партиями гепатоцитов человека Transporter Certified™ (N=2).

Пример 6. Оценивание эффектов двойных комбинаций тестируемых препаратов в отношении липидных профилей.

Комбинации агониста FXR с каждым из агониста PPAR-альфа, агониста PPAR-дельта, двойного агониста PPAR-альфа и дельта (или, в качестве альтернативы, агониста FXR с агонистом PPAR-альфа и агонистом PPAR-дельта) и/или статина оценивают в отношении их потенциала к изменению синтеза холестерина и липидного профиля в гепатоцитах человека. Конкретные оцениваемые комбинации представляют собой

агонист FXR с агонистом PPAR-альфа

агонист FXR с агонистом PPAR-дельта

агонист FXR с двойным агонистом PPAR-альфа и дельта и/или агонист FXR с агонистом PPAR-альфа и агонистом PPAR-дельта;

агонист FXR со статином

Изменения оценивают в гепатоцитах человека в многослойной культуре (SCHN) после 72 ч воздействия тестируемых препаратов в 3 различных концентрациях. Дозируемые растворы получают свежими ежедневно в культуральной среде, и дозирование в SCHN происходит ежедневно в течение 3 дней. Эксперимент осуществляют в 24-луночном формате с применением одной партии гепатоцитов человека Transporter Certified™ (N=1). Каждое условие тестирования выполняют в трех лунках с получением данных в трех повторностях (выраженных как среднее значение±среднеквадратическое отклонение). Образцы получают и анализируют для определения глобального профиля липидов, как подробно описано в примере 5. Изменения липидных профилей и синтеза холестерина сравнивают с эффектами от введения по отдельности в примере 2.

Пример 7. Оценивание эффектов тройных комбинаций тестируемых препаратов в отношении липидных профилей.

Тройную комбинацию агониста FXR, агониста PPAR-альфа, агониста PPAR-дельта, двойного агониста PPAR-альфа и дельта (или агониста PPAR-альфа в комбинации с агонистом PPAR-дельта) и/или статина оценивают в отношении потенциала к изменению синтеза холестерина и липидного профиля в гепатоцитах человека. Изменения оценивают в гепатоцитах человека в многослойной культуре (SCHN) после 72 ч воздействия тестируемых препаратов в 3 различных концентрациях. Дозируемые растворы получают свежими ежедневно в культуральной среде, и дозирование в SCHN происходит ежедневно в течение 3 дней. Эксперимент осуществляют в 24-луночном формате с применением одной партии гепатоцитов человека Transporter Certified™ (N=1). Каждое условие тестирования выполняют в трех лунках с получением данных в трех повторностях (выраженных как среднее значение±среднеквадратическое отклонение). Образцы получают и анализируют для определения глобального профиля липидов, как подробно описано в примере 2. Изменения липидных профилей и синтеза холестерина сравнивают с эффектами от комбинаций, вводимых в примере 2. Конкретные оцениваемые комбинации представляют собой

агонист FXR с агонистом PPAR-альфа и статином;

агонист FXR с агонистом PPAR-дельта и статином;

агонист FXR с двойным агонистом PPAR-альфа и дельта (или, в качестве альтернативы, агонистом PPAR-альфа и агонистом PPAR-дельта) и статином.

Образцы получают и анализируют для определения глобального профиля липидов, как подробно описано в примере 4. Изменения липидных профилей и синтеза холестерина сравнивают с эффектами от комбинаций, вводимых в примерах 4 и 5.

Пример 8. Исследования на животных.

Животные

Животных содержат по отдельности в стандартных клетках при 22°C с циклом чередования света и темноты 12 ч:12 ч. Самцам мышей C57BL/6 (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн) обеспечивают неограниченный доступ к рациону, обогащенному жирами (40% ккал, шортенинг Примекс на основе частично гидрогенизированного растительного масла), фруктозой (22% по весу) и холестерином (2% по весу) (Research Diets, Нью-Брансуик, Нью-Джерси, № по кат. D09100301). Рацион с низким содержанием жиров (10% ккал; далее в данном документе именуемый как LFD) без фруктозы или холестерина применяют в качестве контрольного рациона (Research Diets, № по кат. D09100304). Применение этого утвержденного LFD определяет группу контрольных мышей, которая сохраняет "нормальный" фенотип печени, для сравнения с животными, которым давали экспериментальный рацион.

Группы обработки

Контрольная группа HFD.

Контрольная группа LFD.

HFD+AGONIST FXR.

HFD+PPAR α (т.е. фенофибрат, гемифиброзил, безафибрат или ципрофибрат).

HFD+PPAR δ (т.е. GW501516).

HFD+PPAR α +PPAR δ .

HFD+двойной PPAR α/δ (т.е. GFT505).

HFD+статаин (т.е. аторвастатин, симвастатин, розувастатин).

HFD+AGONIST FXR+PPAR α .

HFD+AGONIST FXR+PPAR δ .

HFD+AGONIST FXR+PPAR α +PPAR δ .

HFD+AGONIST FXR+двойной PPAR α/δ .

HFD+AGONIST FXR+статаин.

Гистологический анализ и анализ цифровых изображений

При выведении из эксперимента правую медиальную и/или левую латеральную доли печени ($\geq 50\%$

каждой собранной дольки) отрезают и фиксируют в 10% нейтральном забуференном формалине (в течение по меньшей мере 7 дней при комнатной температуре). Ткань печени осторожно отрезают для выбора срезов сходного размера, характерных как для края, так и для центра ткани. Ткань печени заливают в парафин, нарезают на срезы (5 мкм) и монтируют. Окрашивание гематоксилином и эозином применяют для морфологических анализов, а окрашивание трихромом по Массону и сириусом красным применяют для оценки фиброза печени.

Гистопатологический анализ осуществляют патологоанатом в слепом режиме исследования. NAFLD и NASH оценивают в баллах посредством применения критериев, изложенных в общих чертах Kleiner и соавторами. Для количественной оценки фиброза цельные срезы, окрашенные сириусом красным, сканируют путем применения системы сканирования цельных микропрепараторов ScanScope CS (Aperio, Виста, Калифорния) при увеличении х20. Извлекают изображения и профили экспрессии коллагена, окрашенного сириусом красным, из целых тканей измеряют посредством способа на основе цветового куба с применением программного обеспечения Image-Pro Analyzer (MediaCybernetics v.6.2, Бетесда, Мэриленд). Общее окрашивание коллагена (представленное как % от общей площади) оценивают по трем четырем иллюстративным срезам от каждого животного (за исключением комплексного эксперимента по оценке фиброза печени, где оценивают дополнительные срезы). Все гистологические анализы осуществляют в слепом режиме.

Биопсия печени

Мышей анестезируют изофлураном (2-3%) в 100% кислороде. Делают небольшой абдоминальный разрез на ~0,5 см левее срединной линии и обнажают левую латеральную долю печени. Клиновидный фрагмент ткани печени (~50 мг) отрезают от дистальной части доли, немедленно помещают во флакон и мгновенно замораживают в жидком азоте. Клиновидный фрагмент рассасывающейся желатиновой губки (GelFoam, Pfizer, Нью-Йорк) вставляют между краями разреза печени. Как только достигается гемостаз (как правило, в течение 1 мин) и желатиновая губка хорошо прилипает к месту биопсии, печень возвращают в брюшную полость, стенку брюшной полости зашивают, а кожу соединяют скобами. Мыши получают однократную инъекцию бупренорфина (0,05 мг/кг, подкожно) во время хирургической операции для контроля боли после операции. Мыши с имитацией операции подвергаются идентичной процедуре, за исключением того, что в печени не производится разрез.

Анализ плазмы и сыворотки крови

Уровни глюкозы, триглицеридов, общего холестерина, аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) в плазме крови измеряют посредством применения биоанализатора Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Сентер-Вэлли, Пенсильвания). Образцы плазмы крови разбавляют 1:10 в PBS для измерения уровней ALT и AST. Общий адипонектин плазмы крови и инсулин в сыворотке крови натощак измеряют согласно инструкциям производителя с помощью коммерчески доступных наборов для электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, Мэриленд).

Количественная оценка общего содержания липидов и коллагена в печени

Общие липиды печени экстрагируют из печени с применением протокола на основе материалов Folch et al. Замороженную ткань печени (~0,3 г) гомогенизируют в 10 мл раствора хлороформ-метанол 2:1. Гомогенат фильтруют с применением обезжиренной фильтровальной бумаги и переливают через воронку в предварительно взвешенный стеклянный флакон объемом 15 мл. Добавляют дополнительные 5 мл раствора хлороформ-метанол 2:1, а затем 2,5 мл 0,9% NaCl. Липиды разделяют с помощью центрифугирования при 1800 g, 10°C в течение 5 мин, водный слой сливают и пробирку продувают азотом до тех пор, пока липидный осадок не станет сухим. Пробирку, содержащую липидный осадок, повторно взвешивают и рассчитывают общее количество экстрагированных липидов на грамм целой печени. Общее содержание коллагена в печени измеряют путем колориметрического определения гидроксипролиновых остатков посредством кислотного гидролиза коллагена (Quickzyme, Лейден, Нидерланды).

Определение экстрагируемого белка коллагена 1 α 1 посредством белкового блота

Сердцевины ткани (50-100 мг) отбирают из левой латеральной доли печени, мгновенно замораживают в жидком азоте и хранят при -80°C до обработки. Ткань гомогенизируют в лизирующем буфере, содержащем ингибиторы протеазы. Концентрацию белка в очищенной надосадочной жидкости измеряют с помощью набора для анализа белка с использованием BCA (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Лизаты ткани печени (~50 мкг) разделяют в 4-12% гелях NuPAGE (Life Technologies, Карлсbad, Калифорния) в восстанавливающих условиях и переносят на нитроцеллюлозные мембранны. Мембранны разрезают между маркерами размером 50 и 60 кДа и блокируют с помощью 5% Blotto. Верхнюю половину зондируют антителом к коллагену 1 α 1 (1:1000; № по кат. NBP1-30054; Novus Biologicals, Литлтон, Колорадо), которое выявляет COOH-концевую телопептидную часть белка коллагена 1 α 1. Для нормализации нижнюю половину зондируют антителом к глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, 1:7500; № по кат. 3683; Cell Signaling Technologies, Данверс, Массачусетс). После инкубирования с антителом к иммуноглобулину кролика, конъюгированного с пероксидазой хрена, экспрессию белка выявляют с помощью усиленной хемилюминесценции (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс) и денситометрию осуществляют с помощью системы FluorChem (Cell Biosciences, Санта-Клара, Калифорния). Денситометрический анализ кол-

лагена 1 α 1 охватывает как зрелый белок размером 140 кДа, так и несколько большую полосу, соответствующую гликозилированной форме или частично процессированному белку коллагену 1 α 1.

Изменения экспрессии генов печени

Образцы ткани левой латеральной доли печени собирают с помощью пробоотборника для тканей размером 6 мм или с помощью способа биопсии, мгновенно замораживают в жидким азоте и хранят при -80°C до обработки. Общую РНК из образцов печени (~50-150 мг) экстрагируют путем применения реагента TRI (Life Technologies) и затем дополнительно очищают с применением набора Qiagen RNeasy Plus Mini (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Целостность РНК определяют с применением набора Agilent 6000 Nano на Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния). кДНК получают путем применения набора для высокопроизводительного синтеза кДНК путем обратной транскрипции (Life Technologies). Изменения экспрессии генов подтверждают с помощью продуктов для анализа экспрессии генов Assays-on-Demand и универсального мастер-микса в формате TaqMan (Life Technologies) на приборе ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния). Изменение экспрессии генов рассчитывают с помощью сравнительного способа расчета значений порогового цикла (CT) с использованием пептидилпролилизомеразы A (Pripa) и Gapdh для нормализации. При использовании генных чипов образцы кДНК прогоняют на чипах для ПЦР RT2 Profiler для исследования фиброза у мышей (PAMM-120C, мастер-микс с SYBR Green/ROX для количественной ПЦР на RT2; SABiosciences) посредством применения системы ABI Prism 7900HT для быстрой ПЦР в режиме реального времени (Applied Biosystems). Изменения экспрессии генов на чипе рассчитывают с помощью сравнительного способа расчета значений CT с применением программного обеспечения DataAssist v3.0 (Applied Biosystems/Life Technologies). Среди пяти генов "домашнего хозяйства", включенных в чип для ПЦР RT2 Profiler для исследования фиброза у мышей, гипоксантиинфосфорибозилтрансфераза 1 (Hprt) и Gapdh характеризуются наиболее стабильной экспрессией в соответствии с балльными оценками стабильности, рассчитанными с помощью DataAssist v3.0. Среднее значение для выбранных эндогенных контрольных генов применяют в качестве коэффициента нормализации для расчета относительной экспрессии каждого гена. Для подтверждения результатов, полученных посредством применения чипа для исследования фиброза, проводят анализы экспрессии генов в формате TaqMan для выбора генов, определенных с помощью чипа как характеризующихся повышенной, пониженней или неизмененной экспрессией.

Пример 9. Клиническое исследование.

Многоцентровое, двойное слепое, плацебо-контролируемое, рандомизированное клиническое исследование в параллельных группах проводили с участием пациентов с нецирротическим неалкогольным стеатогепатитом для оценки лечения обетихолевой кислотой, даваемой перорально (25 мг ежедневно), или плацебо в течение 72 недель. Пациентов рандомизировано разделяли 1:1 с помощью компьютерной централизованно управляемой процедуры со стратификацией по клиническому центру и диабетическому статусу. Первой конечной точкой исследования было улучшение централизованно оцениваемых в баллах гистологических показателей печени, определяемое как уменьшение балльной оценки активности неалкогольной жировой болезни печени по меньшей мере на 2 пункта без усугубления фиброза от начального момента до конца лечения. Измеряли изменение уровня аланинаминотрансферазы через 24 недели: относительное изменение уровня аланинаминотрансферазы -24%, 95% CI от -45 до -3.

План исследования и участники

Пациентов включали в исследование в соответствии со следующими критериями включения: возраст 18 или более лет на момент скрининга, гистологические проявления четко выраженного или пограничного неалкогольного стеатогепатита на основании результатов биопсии печени, полученных за 90 дней или менее до рандомизации, и гистологическая балльная оценка активности неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) 4 или более с балльной оценкой 1 или более для каждого компонента балльной оценки (балльная оценка стеатоза 0-3, баллонирования 0-2 и долькового воспаления 0-3). Определение степени и стадии заболевания по биоптатам для целей включения в исследование осуществляли в исследовательском центре, в котором происходило включение в исследование. Критерии исключения включают наличие цирроза, другие причины заболевания печени, значительное потребление алкоголя (>20 г/день для женщин или >30 г/день для мужчин) или другие исказжающие условия (см. ниже).

Рандомизация и маскировка

Пациентов, удовлетворяющих критериям отбора, рандомизировано разделяли (1:1) на принимающих перорально обетихолевую кислоту по 25 мг один раз в день или плацебо. Обетихолевая кислота и плацебо были представлены в виде идентичных таблеток в идентичных контейнерах, помеченных кодовыми числами. Распределение в группы лечения замаскировано для пациентов, исследователей, сотрудников клинических исследовательских центров и патологоанатомов.

Процедуры

После рандомизации пациенты возвращались с визитами, предусмотренным исследованием, в недели 2, 4 и 12 и затем каждые 12 недель до завершения лечения в неделю 72, а затем 24 недели спустя. Во время этих визитов получали образцы крови для стандартных биохимических тестов и оценки концентраций липидов, глюкозы и инсулина натощак. Вес тела, рост и обхват талии и бедер измеряли при

первоначальной оценке и в намеченные промежуточные моменты времени. Все пациенты получали стандартные рекомендации о навыках здорового питания, снижении веса, физических упражнениях и контроле гипертензии, гиперхолестеринемии и сахарного диабета при наличии показаний.

Биоптаты печени в начальный момент и в конце лечения централизованно оценивались группой экспертов для получения консенсусной балльной оценки каждого компонента балльной оценки активности NAFLD, определения стадии фиброза и установления диагноза неалкогольного стеатогепатита, по-граничного неалкогольного стеатогепатита или отсутствия неалкогольного стеатогепатита.

Критерии включения и исключения

Пациенты, которые удовлетворяли любым из следующих критериев исключения, считались неподходящими для включения в исследование: 1) существующее на данный момент или имеющее место в анамнезе значительное потребление алкоголя в течение периода более трех последовательных месяцев в пределах 1 года до скрининга (значительное потребление алкоголя определяли как в среднем более 20 г/день у женщин и более 30 г/день у мужчин); 2) неспособность достоверно количественно оценить потребление алкоголя по мнению исследователя центра; 3) употребление лекарственных средств, по имеющимся сведениям ассоциированных с развитием NAFLD, в течение более 2 недель в год перед рандомизацией; 4) ранее проведенная или планируемая бariatрическая хирургическая операция или процедура; 5) неконтролируемый сахарный диабет, определяемый как уровень HbA1c, составляющий 80,3 ммоль/моль или выше, в пределах 60 дней до включения в исследование; 6) наличие цирроза по результатам биопсии печени, 7) количество тромбоцитов <100×10⁹/л; 8) клинические проявления декомпенсации печени, определяемой по наличию любых из следующих аномалий: уровень альбумина в сыворотке крови менее 32 г/л, INR более 1,3, уровень прямого билирубина более 22,2 мкмоль/л или варикозное расширение вен пищевода, асцит или печеночная энцефалопатия в анамнезе; 9) проявление других форм хронической печеночной недостаточности: гепатит В, определяемый по наличию поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), гепатит С, определяемый по наличию РНК вируса гепатита С (HCV) или положительному результату теста на антитела к вирусу гепатита С (антитела к HCV), проявление продолжающегося аутоиммунного заболевания печени, определяемого по соответствующим гистологическим показателям печени, первичный билиарный цирроз, определяемый по наличию по меньшей мере 2 критериев (биохимических проявлений холестаза главным образом на основании повышения уровня щелочной фосфатазы, наличия антимитохондриального антитела [AMA] и гистологических проявлений негнойного деструктивного холангита и разрушения междольковых желчных протоков), первичный склерозирующий холангит, болезнь Вильсона, определяемая по уровню церулоплазмина ниже пределов нормы и соответствующим гистологическим показателям печени, дефицит альфа-1-антитрипсина (Α1ΑΤ), определяемый по диагностическим признакам в гистологическом анализе печени (подтверждаемый уровнем альфа-1-антитрипсина ниже нормального, исключение по усмотрению исследователя центра), гемохроматоз или перегрузка железом в анамнезе, определяемая по наличию в биоптате печени окрашивающегося железа со степенью отложения 3+ или 4+, заболевание печени, индуцированное лекарственными средствами, определяемое на основании обычного воздействия и анамнеза, известное нарушение проходимости желчных протоков, предполагаемый или подтвержденный рак печени или любой другой тип заболевания печени, отличный от NASH; 10) уровень аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови более 300 ед./л; 11) уровень креатинина в сыворотке крови, составляющий 176,8 мкмоль/л или более; 12) невозможность безопасного получения биоптата печени; 13) отведение желчи в анамнезе; 14) известный положительный результат теста на инфекцию, вызываемую вирусом иммунодефицита человека (HIV); 15) активное, серьезное заболевание внутренних органов с вероятной ожидаемой продолжительностью жизни менее 5 лет; 16) активное злоупотребление химическими веществами, в том числе ингаляционными или инъекционными лекарственными средствами, в год перед скринингом; 17) беременность, запланированная беременность, вероятность беременности и нежелание применять эффективные противозачаточные средства во время испытания или кормление грудью; 18) участие в испытании IND в период 30 дней до рандомизации; 19) любое другое состояние, которое по мнению исследователя центра будет препятствовать соблюдению режима или мешать завершению исследования; или 20) отказ дать информированное согласие.

Статистический анализ

Первичную конечную точку и бинарные вторичные конечные точки анализировали с применением критерия Маннеля-Гензеля; непрерывные вторичные конечные точки анализировали с применением моделей ANCOVA, устанавливающих связь изменения непрерывной конечной точки от начального момента до 72 недели с группой лечения и исходным значением конечной точки. Статистические анализы осуществляли с помощью SAS (SAS Institute 2011, Base SAS 9.3 Procedures Guide) и Stata (StataCorp 2013, Stata Statistical Software: release 13).

Конечные точки

Первичной конечной точкой исследования было улучшение централизованно оцениваемых в баллах гистологических показателей печени, определяемое как уменьшение балльной оценки активности NAFLD по меньшей мере на 2 пункта без усугубления фиброза от начального момента до конца лечения. Усугубление фиброза определяли как любое увеличение номера стадии. Вторичные гистологические

конечные точки включают разрешение неалкогольного стеатогепатита, изменение балльной оценки активности NAFLD и изменения индивидуальных балльных оценок гепатоцеллюлярного баллонирования, стеатоза, долькового и портального воспаления и фиброза. Улучшение течения фиброза определяли как любое уменьшение номера стадии. Стадии фиброза 1а, 1б и 1с рассматривали как стадию 1 для целей анализа. Другие вторичные конечные точки включают изменения концентраций аминотрансферазы и γ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови от начального момента до 72 недели, индекс гомеостатической модели оценки инсулинерезистентности натощак (HOMA-IR), антропометрические показатели (вес, индекс массы тела, соотношение окружностей талии и бедер, обхват талии) и балльные оценки качества жизни, связанного со здоровьем.

Пример 10. Анализ данных.

Субанализ данных, полученных в примере 9, осуществляли для оценки эффекта статинов в отношении уровней холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C). Цели этих вторичных анализов заключались в определении эффекта ОСА по сравнению с плацебо в подгруппе пациентов с более тяжелым NASH и в оценке эффектов сочетанного применения статинов в отношении уровня холестерина LDL в сыворотке крови. Данные о субъектах оценивали в трех группах, как указано ниже.

Группа А (n=64, не принимавшие статин) включала субъектов из группы лечения обетихолевой кислотой (ОСА), которые не принимали статин в начальный момент (день 0) и которые не начинали принимать статин на протяжении всего хода исследования до недели 72 включительно.

Группа В (n=47, принимавшие статин в начальный момент) включала субъектов из группы лечения с помощью ОСА, которые принимали статин в начальный момент и которые продолжали принимать статин во время исследования до недели 72 включительно.

Группа С (n=23, перешедшие к приему статина) включала субъектов из группы лечения с помощью ОСА, которые не принимали статин в начальный момент, но начали лечение статином в момент времени после начального момента до недели 72 включительно.

Следующие расчеты осуществляли для субъектов, получавших лечение с помощью ОСА в группах А, В и С.

Средние и медианные характеристики, перечисленные ниже, оценивают в начальный момент и в неделю 72:

данные лабораторных анализов: уровни LDL-C, холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL-C), аланин- и аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы;

возраст;

пол: процентная доля мужчин, процентная доля женщин;

процентная доля больных сахарным диабетом;

гистологические показатели: стеатоз, баллонирование, воспаление, фиброз.

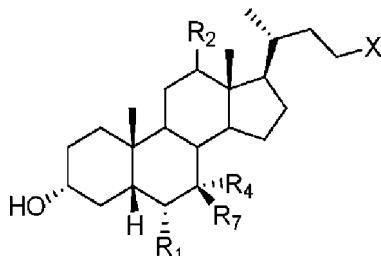
Оценивают среднее и медианное процентное изменение вышеперечисленных характеристик в неделю 72 по сравнению с начальным моментом.

Результаты

Уровень холестерина LDL повышался в ходе лечения с помощью ОСА у пациентов, принимавших статин в начальный момент, но эти уровни не превышали таковые у пациентов, получавших лечение плацебо и не принимавших статины. Начало приема статинов в ходе лечения с помощью ОСА способствовало регрессии уровня LDL до значений ниже исходных уровней до введения ОСА. Как показано на фиг. 8, начало терапии статинами в ходе лечения с помощью ОСА, по-видимому, способствует регрессии повышения уровня LDL, связанного с приемом ОСА.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного фарнезоидным X-рецептором (FXR), или заболевания или состояния, связанного с повышенными уровнями липидов, снижения уровня фермента печени, или ингибиции, или обеспечения регрессии фиброза, содержащая терапевтически эффективные количества агониста FXR, безафибрат и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой соединение формулы А:



(А)

или его фармацевтически приемлемую соль, или конъюгат с глицином или таурином, где
 R_1 представляет собой незамещенный C_1 - C_6 -алкил;
 R_2 представляет собой водород или α -гидроксил;
 X представляет собой $C(O)OH$, $C(O)NH(CH_2)_mSO_3H$, $C(O)NH(CH_2)_nCO_2H$ или OSO_3H ;
 R_4 представляет собой гидроксил или водород;
 R_7 представляет собой гидроксил или водород;
 m равно 1, 2 или 3; и
 n равно 1, 2 или 3.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая статин.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где статин выбран из симвастатина, флувастина, правастатина, ривастина, мевастатина, аторвастатина, церивастатина, ловастатина, питавастатина, флуиндостатина, велостатина, далвастатина, розувастатина, дигидрокомпактина и компактина.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где R_1 представляет собой незамещенный C_1 - C_6 -алкил.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, где R_1 представляет собой метил, этил или пропил.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, где R_1 представляет собой этил.

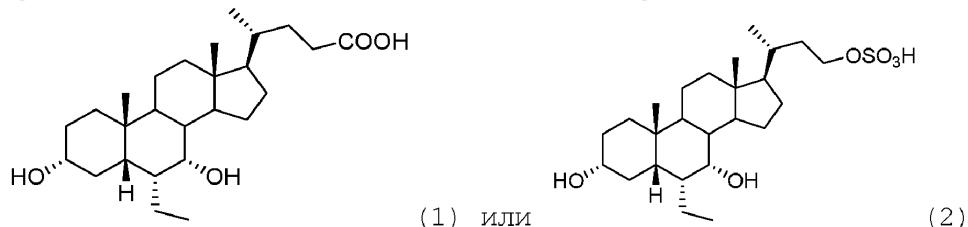
7. Фармацевтическая композиция по п.1, где X выбран из $C(O)OH$, $C(O)NH(CH_2)_2SO_3H$, $C(O)NH(CH_2)CO_2H$, $C(O)NH(CH_2)_2SO_3H$ и $C(O)NH(CH_2)_2CO_2H$.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где X представляет собой $C(O)OH$.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, где X представляет собой OSO_3H .

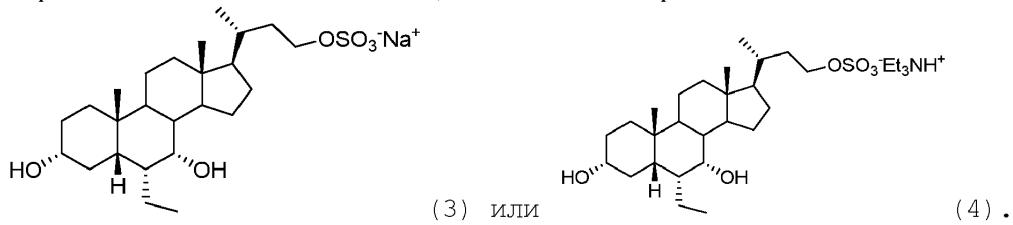
10. Фармацевтическая композиция по п.1, где R_4 представляет собой гидроксил и R_7 представляет собой водород.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, где агонист FXR представляет собой

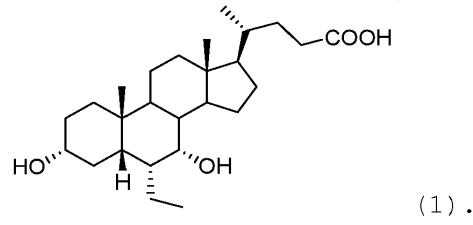


или их фармацевтически приемлемую соль, или конъюгат с глицином или таурином.

12. Фармацевтическая композиция по п.1, где агонист FXR представляет собой



13. Фармацевтическая композиция по п.1, где агонист FXR представляет собой



14. Фармацевтическая композиция по п.13, где заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой первичный билиарный цирроз (PBC).

15. Фармацевтическая композиция по п.13, где заболевание или состояние, опосредованное FXR, представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

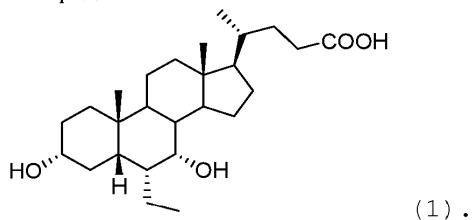
16. Способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, опосредованного FXR, или состояния, связанного с повышенными уровнями липидов, снижения уровня фермента печени, или ингибирования, или обеспечения регрессии фиброза, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп.1-12 субъекту, нуждающемуся в этом.

17. Способ по п.16, где заболевание или состояние выбрано из первичного билиарного цирроза (PBC), первичного склерозирующего холангита (PSC), порталной гипертензии, хологенной диареи, хронической печеночной недостаточности, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), инфицирования гепатитом C, алкогольной болезни печени, поражения печени вследствие прогрессирующего фиброза, фиброза печени, сердечно-сосудистого заболевания и гиперлипидемии.

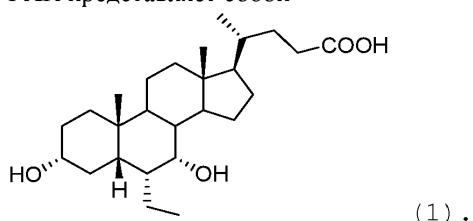
18. Способ по п.16, где состояние выбрано из резистентного первичного билиарного цирроза; пер-

вичного билиарного цирроза, с которым ассоциированы повышение показателей функциональных проб печени и гиперлипидемия; первичного склерозирующего холангита; стеатогепатита, не индуцированного алкоголем; хронической печеночной недостаточности, ассоциированной с гепатитом В, С или употреблением алкоголя; гиперлипидемии, где гиперлипидемия представляет собой первичную гиперлипидемию с генетической составляющей или без нее; и гиперлипидемии, ассоциированной с заболеванием коронарных артерий, цереброваскулярным заболеванием артерий, заболеванием периферических сосудов, формами аневризмы аорты или атеросклерозом сонной артерии.

19. Способ по п.17, где заболевание или состояние представляет собой первичный билиарный цирроз (PBC), и при этом агонист FXR представляет собой



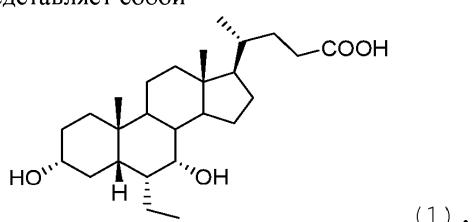
20. Способ по п.17, где заболевание или состояние представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH), и при этом агонист FXR представляет собой



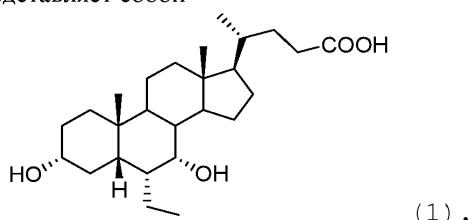
21. Способ ингибирования или обеспечения регрессии фиброза, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп.1-12 субъекту, нуждающемуся в этом.

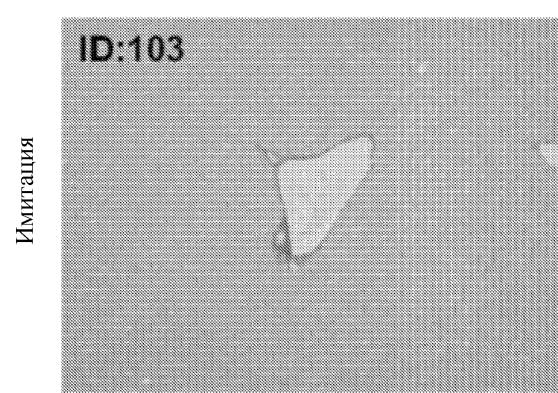
22. Способ по п.21, где фиброз выбран из фиброза печени, фиброза почки и фиброза кишечника.

23. Способ лечения или предупреждения первичного билиарного цирроза (PBC), включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой



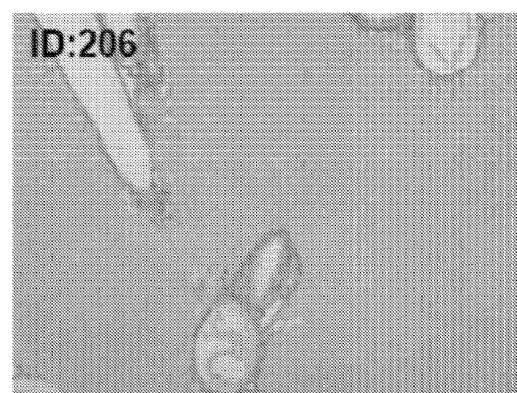
24. Способ лечения или предупреждения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), безафибрата и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, где агонист FXR представляет собой





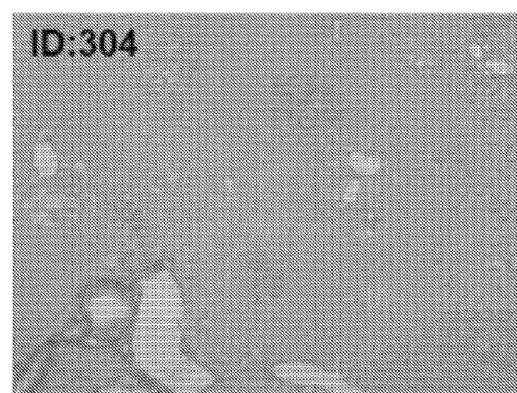
Имитация

Фиг. 1А



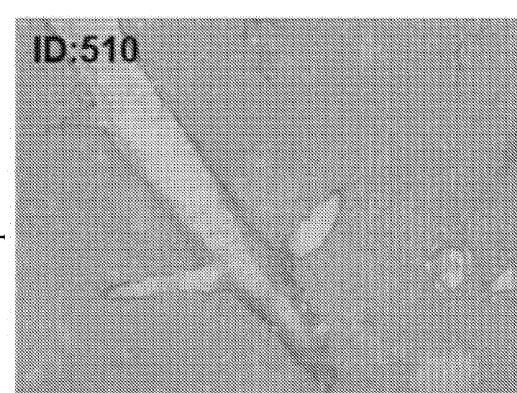
BDL-среда

Фиг. 1В



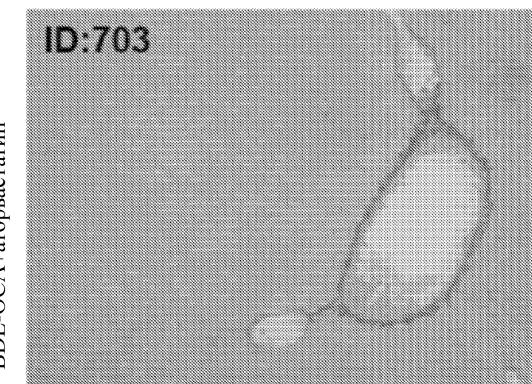
BDL-OCA

Фиг. 1С

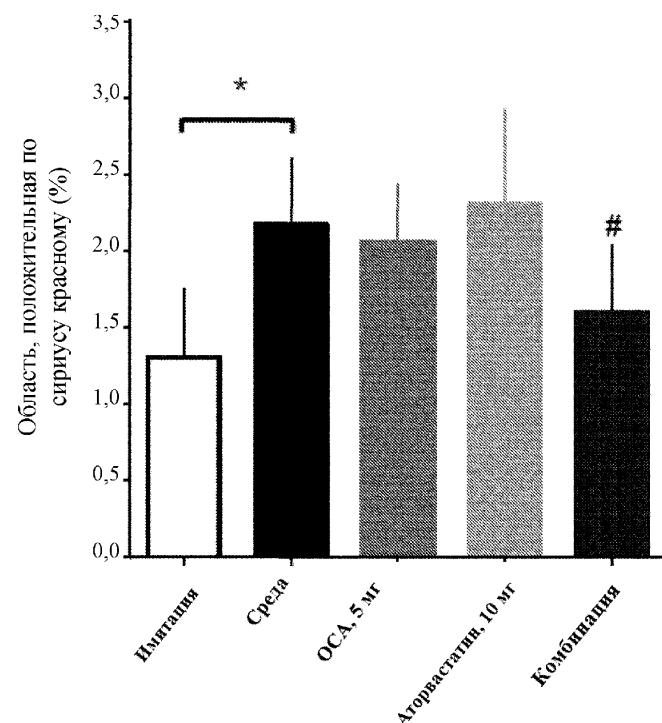


BDL-арогвастатин

Фиг. 1Д



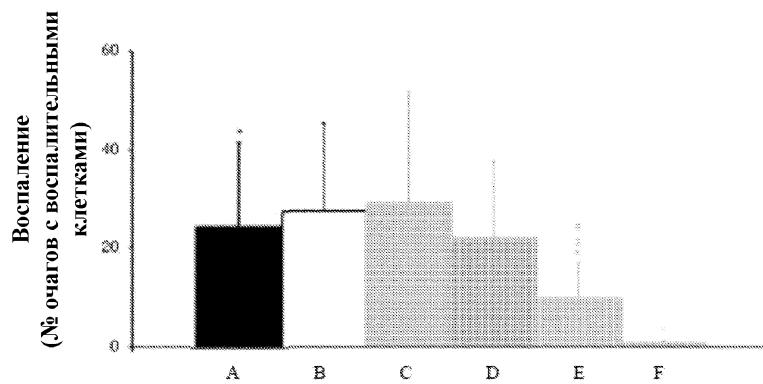
Фиг. 1Е



* $p < 0,5$ по сравнению с контрольной группой с имитацией хирургической операции

$p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой с BDL, получавшей среду

Фиг. 2



Столбик A: эталонная группа, получавшая HFC * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Столбик B: контрольная группа, получавшая HFC # $p < 0,05$ по сравнению с ОСА

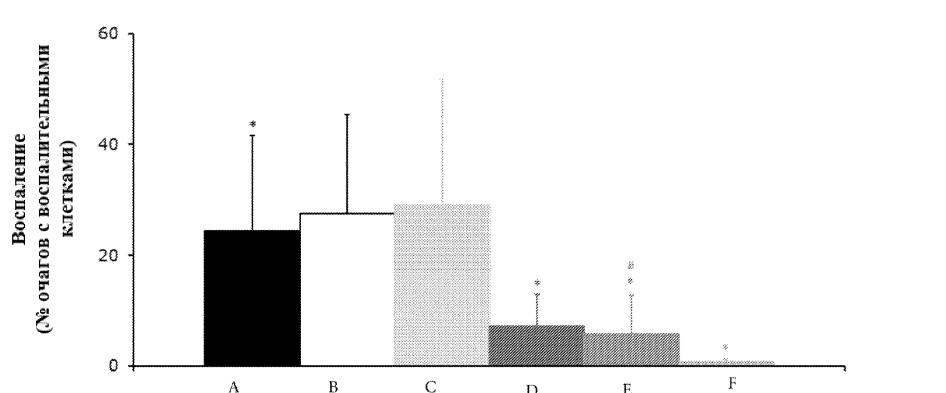
Столбик C: ОСА \$ $p < 0,05$ по сравнению с фенофибратором

Столбик D: низкодозовый фенофибратор

Столбик E: ОСА + низкодозовый фенофибратор

Столбик F: контрольная группа, получавшая корм

Фиг. 3А



Столбик A: эталонная группа, получавшая HFC * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Столбик B: контрольная группа, получавшая HFC # $p < 0,05$ по сравнению с ОСА

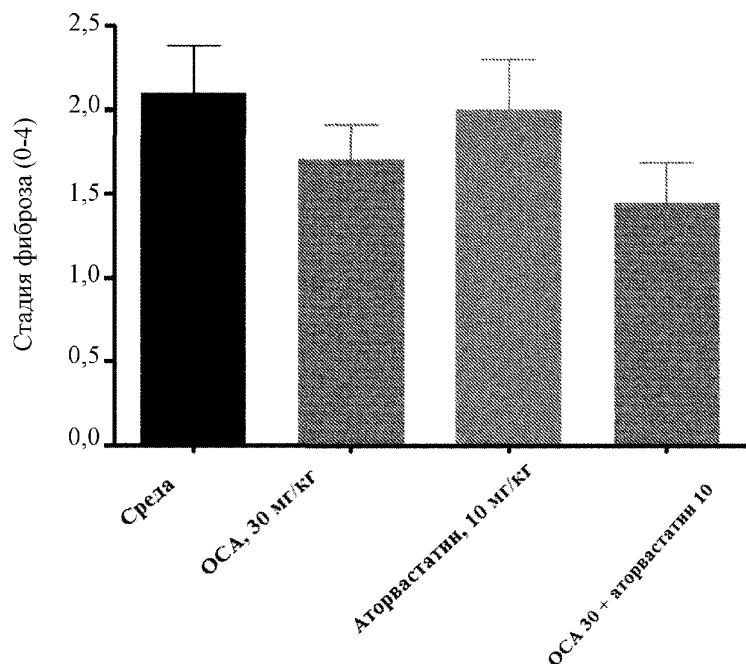
Столбик C: ОСА \$ $p < 0,05$ по сравнению с фенофибратором

Столбик D: низкодозовый фенофибратор

Столбик E: ОСА + низкодозовый фенофибратор

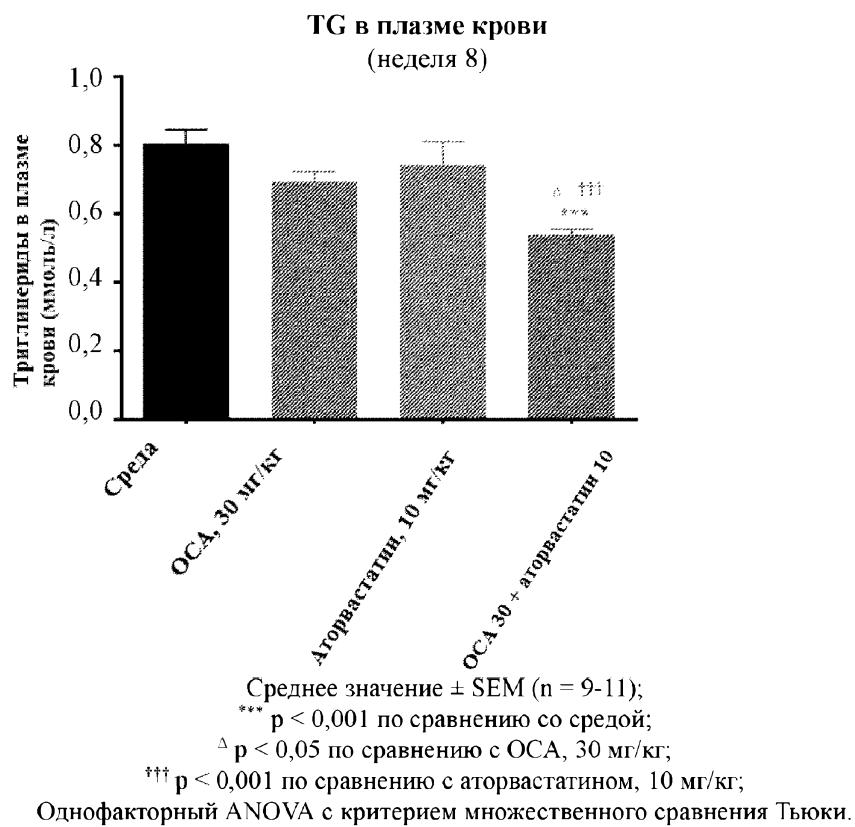
Столбик F: контрольная группа, получавшая корм

Фиг. 3В

Стадия фиброза печени

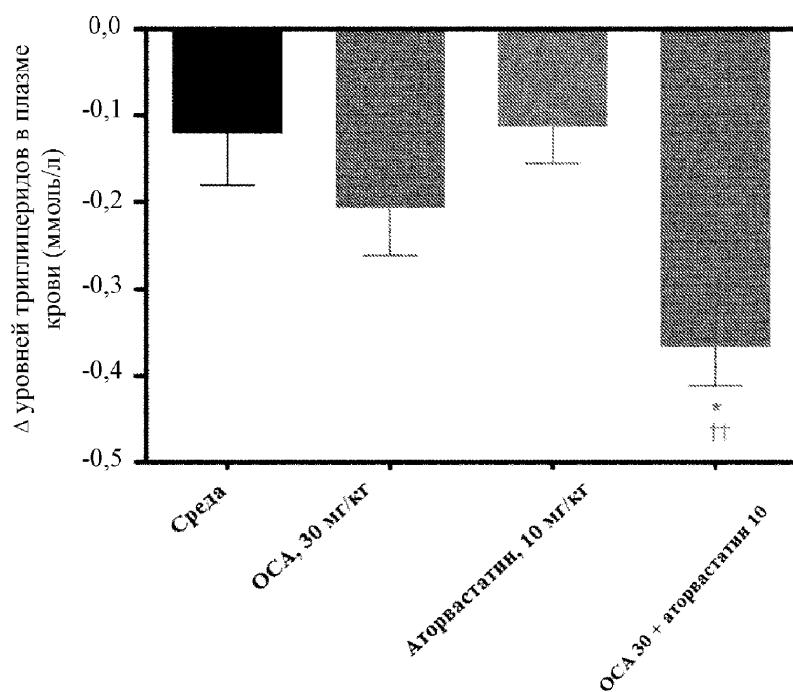
Среднее значение \pm SEM ($n = 9-11$);
NS: однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Тьюки

Фиг. 4



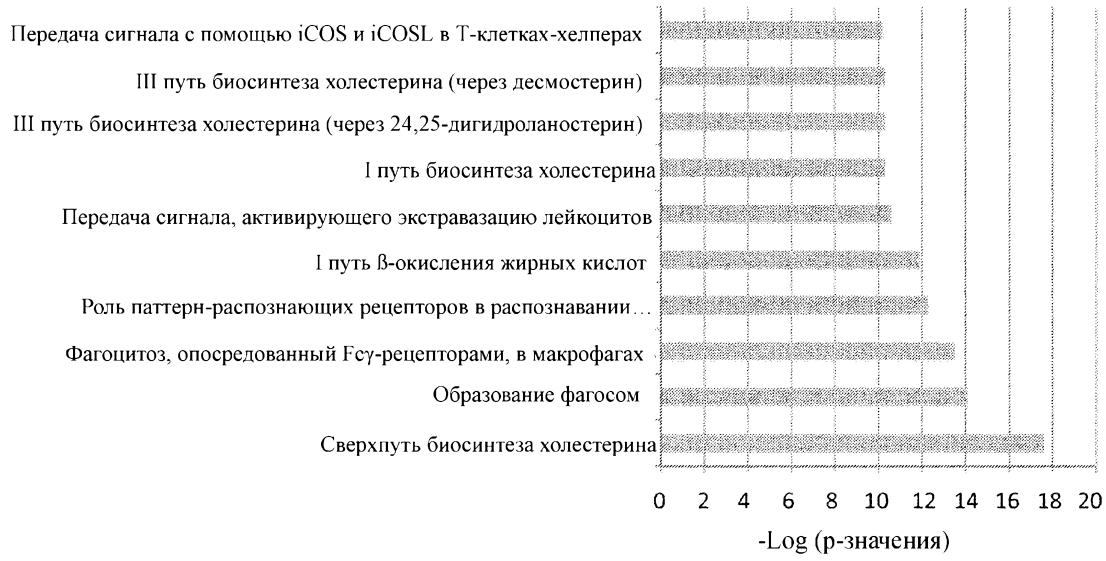
Фиг. 5А

Изменение уровней TG в плазме крови по сравнению с исходным уровнем (неделя 8)

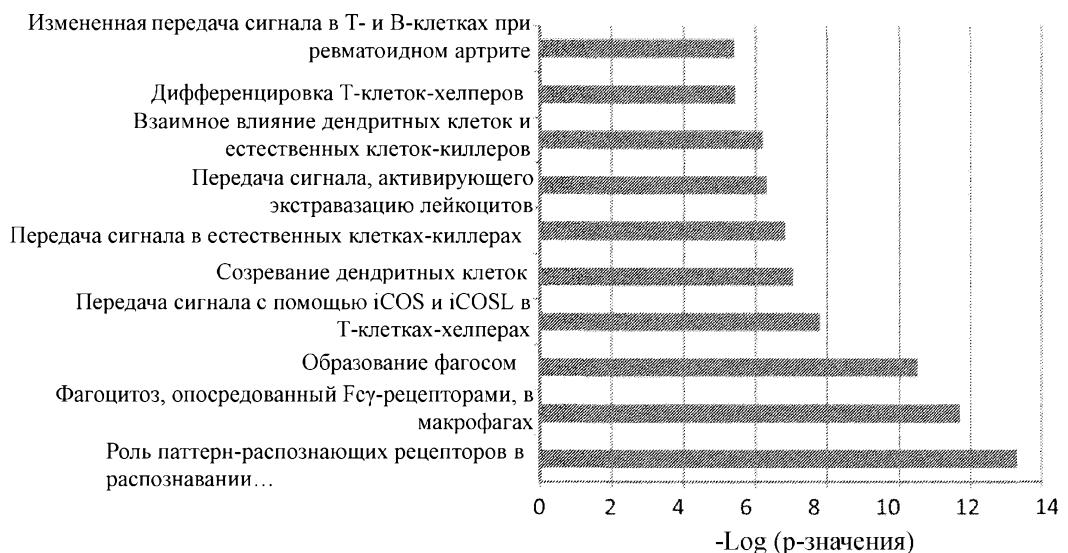


Среднее значение \pm SEM ($n = 9-11$);
 $*$ $p < 0,05$ по сравнению со средой;
 $^{††} p < 0,01$ по сравнению с аторвастатином, 10 мг/кг;
Однофакторный ANOVA с критерием множественного сравнения Тьюки.

Фиг. 5В



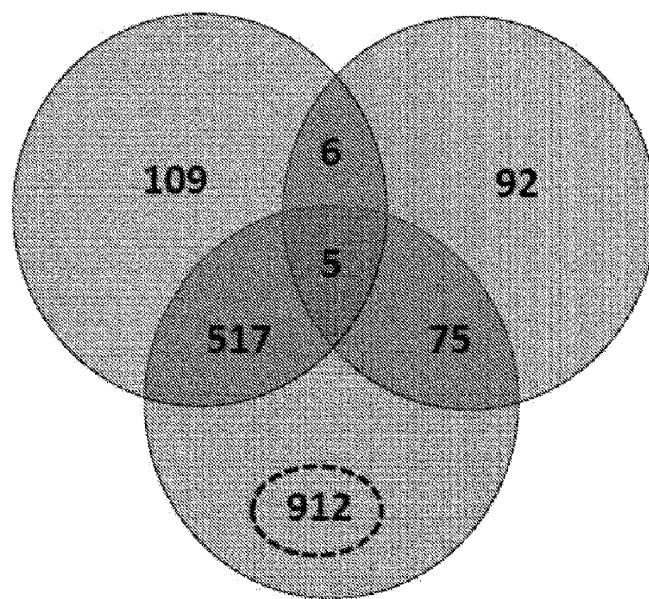
Фиг. 6А



Фиг. 6В

ОСА по сравнению со средой

Фенофибрат по сравнению со средой

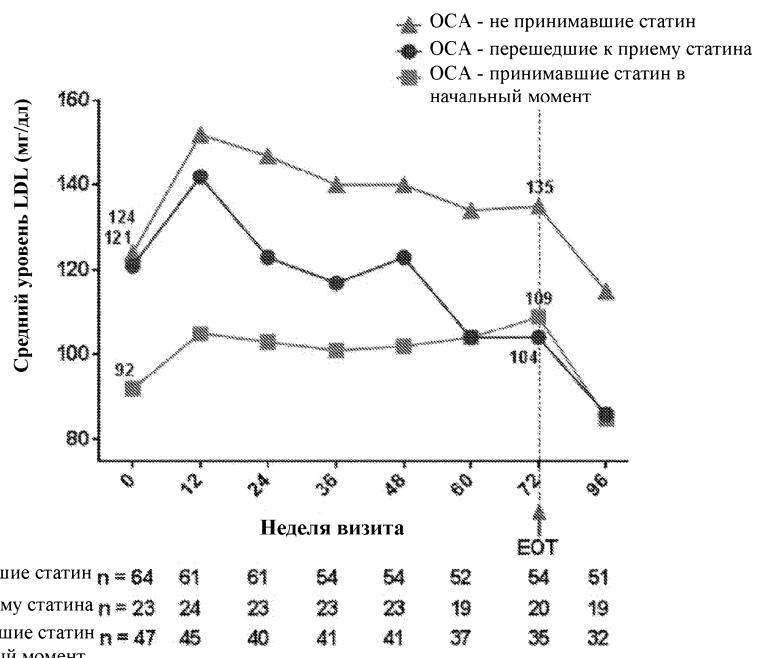


Комбинация по сравнению со средой

Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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