

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 974 281**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/575** (2006.01)  
**C07J 43/00** (2006.01)  
**C07J 9/00** (2006.01)  
**A61K 51/00** (2006.01)  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2016 PCT/US2016/026146**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16164413**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2016 E 16777168 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3280421**

---

⑮ Título: **Composiciones farmacéuticas para terapia de combinación**

⑩ Prioridad:

**07.04.2015 US 201562144040 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2024**

⑮ Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**305 Madison Avenue**  
**Morristown NJ 07960, US**

⑮ Inventor/es:

**PRUZANSKI, MARK y**  
**ADORINI, LUCIANO**

⑮ Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 974 281 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas para terapia de combinación

5 Antecedentes de la divulgación

Los trastornos metabólicos, incluida la diabetes mellitus y el síndrome de resistencia a la insulina, se caracterizan por aberraciones en una amplia variedad de marcadores de riesgo metabólico, como hiperinsulinemia, alteración del metabolismo de la glucosa, niveles plasmáticos elevados de triglicéridos, disminución de los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, aumento de la presión arterial y obesidad. Las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, la disminución de la secreción de insulina y/o el aumento de la resistencia a la insulina pueden estar involucrados en una serie de afecciones, que incluyen cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), varios estados de hepatitis crónica (hepatitis B y C), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Los tratamientos actuales se dirigen a la resistencia a la insulina (por ejemplo, metformina, 10 tiazolidindionas ("TZD")) o la liberación de insulina de la célula beta (por ejemplo, sulfonilureas, exenatida). Sin embargo, 15 estos tratamientos adolecen de diversas deficiencias, incluidos efectos secundarios, eficacia limitada y efectos indeseables a largo plazo.

20 Los ácidos biliares están involucrados en la regulación de varios procesos metabólicos y modulan no solo su propia síntesis y circulación enterohepática, sino también la homeostasis de triglicéridos, colesterol, glucosa y energía. Los ácidos biliares también pueden desempeñar un papel adicional en la modulación de la liberación de incretina y en la regulación metabólica a través de la modulación del gasto de energía. Además, los secuestrantes de ácidos biliares (BAS) han 25 demostrado su papel en el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas, como NAFLD y NASH, disglucemias y diabetes tipo II.

25 Los ácidos biliares se unen al receptor nuclear FXR, que participa en la homeostasis de los ácidos biliares. Se ha sugerido que la diabetes está asociada con una desregulación de la expresión de FXR. El FXR parece no solo desempeñar un papel en la modificación de la expresión génica inducida por carbohidratos, así como en la producción de glucosa hepática durante la utilización de glucosa hepática posprandial y en ayunas, sino que también está involucrado en la regulación de 30 una compleja serie de genes gluconeogénicos que son necesarios para prevenir la hipoglucemias en ayunas a través del mantenimiento de la producción de glucosa hepática posprandial y el almacenamiento de glucógeno. Además, la activación de FXR inhibe la inducción de genes que responden a la glucosa, como la piruvato quinasa de tipo L (L-PK), en el estado posprandial.

35 Por lo tanto, existen necesidades no satisfechas de composiciones farmacéuticas que comprendan agonistas de FXR y al menos un agente terapéutico adicional que disminuya el nivel de glucosa en sangre, estimule la secreción de insulina y/o aumente la sensibilidad a la insulina, para tratar o prevenir diversas enfermedades o afecciones asociadas con un nivel elevado de glucosa en la sangre, disminución de la secreción de insulina y/o disminución de la sensibilidad a la insulina. La presente solicitud aborda tales necesidades.

40 Ahmad H Ali *et al*: "Recent advances in the development of farnesoid X receptor agonists", Annals of translational medicine, 2015;3(1):5, divulga un estudio clínico que muestra los efectos beneficiosos del ácido obeticólico en combinación con insulina en pacientes con NAFLD. El resumen del póster de Matthew Armstrong *et al*: "Effect of liraglutide on adipose 45 insulin resistance and hepatic de-novo lipogenesis in non-alcoholic steatohepatitis: substudy of a phase 2, randomized placebo-controlled trial", 26 February 2014 divulga los efectos beneficiosos del análogo de GLP-1 liraglutida en NASH.

Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de ácido obeticólico (OCA) y liraglutida (LIRA), solos y en combinación, sobre el NAS total. \*p<0,05 frente al control y \$p<0,05 frente al OCA. La Figura 1B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación, en el NAS total. \*p<0,05 frente al control.

55 La Figura 2A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el componente de esteatosis de NAS. \*p<0,05 frente al control y \$p<0,05 frente al OCA.

La Figura 2B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el componente de esteatosis de NAS. \*p<0,05 frente al control, \$p<0,05 frente al OCA y ^p<0,05 frente a LIRA.

60 La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el contenido total de triglicéridos en el hígado. ###p<0,001 frente al vehículo LEAN-CHOW (alimento magro), \*\*\*p<0,001 frente al vehículo DIO-NASH; y ^p<0,05 frente a OCA DIO-NASH (10 mg/kg). La Figura 3B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el contenido total de triglicéridos en el hígado. ###p<0,001 frente al vehículo LEAN-CHOW, \*\*p<0,05 y \*\*\*p<0,001 frente al vehículo DIO-NASH.

65 La Figura 4A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación,

sobre el contenido total de colesterol hepático.  $###p<0,001$  frente al vehículo LEAN-CHOW;  $*p<0,05$  y  $***p<0,001$  frente al vehículo DIO-NASH. La Figura 4B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el contenido total de colesterol hepático.  $###p<0,001$  frente al vehículo LEAN-CHOW;  $**p<0,01$  y  $***p<0,001$  frente al vehículo DIO-NASH.

5

La Figura 5 es una gráfica que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el peso corporal durante el período de estudio.

La Figura 6A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el cambio en la masa de tejido graso en relación con el peso corporal. La Figura 6B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación, sobre el cambio en la masa tisular en relación con el peso corporal.

Las Figuras 7A-7E describen el efecto sobre los genes regulados únicamente por una dosis baja de OCA y LIRA, solos y en combinación.  $*p<0,005$  frente al vehículo de control. La Figura 7A es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión del efector C similar a DFFA inductor de muerte celular. La Figura 7B es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión de la proteína de unión a DNS que contiene el dominio efecto de muerte. La Figura 7C es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión de 2-hidroxiacil-CoA-lisasa. La Figura 7D es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión de lectina, proteína de unión a galactosa. La Figura 7E es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión del receptor 3 similar a la proteína de unión a oxisterol.

Las Figuras 8A-8D describen el efecto sobre el nivel de expresión de genes regulados únicamente por una dosis alta de OCA y LIRA, solos y en combinación.  $*p<0,005$  frente al vehículo de control y  $#p<0,05$  frente al

25

vehículo de control. La Figura 8A es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión del receptor de estrógeno 1. La Figura 8B es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión del gen 2 inducido por insulina. La Figura 8C es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión de lipina 1.

30

La Figura 8D es un gráfico de barras que muestra el efecto sobre el nivel de expresión de la proteína bisagra de ubiqüinol-citocromo C reductasa.

35

La Figura 9A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y metformina (MET), solos y en combinación, en el NAS total.  $*p<0,005$  frente al vehículo de control. La Figura 9B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre el componente de esteatosis de NAS.

40

La Figura 10A es una gráfica que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, en la reducción de la glucosa en sangre mediante el uso de OGTT en la semana 4.  $##p<0,001$  frente a vehículo LEAN-CHOW,  $**p<0,01$  y  $***p<0,001$  frente a vehículo DIO-NASH,  $^{\Delta\Delta}p<0,05$  frente a DIO-NASH OCA (10 mg/kg) y  $^{\Delta\Delta\Delta}p<0,05$  frente a DIO-NASH MET (50 mg/kg). La Figura 10B es una gráfica que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, en la reducción de la glucosa en sangre mediante el uso de OGTT en la semana 4.  $##p<0,001$  frente al vehículo LEAN-CHOW,  $*p<0,05$ ,  $***p<0,001$  frente a vehículo DIO-NASH; y  $^{\Delta}p<0,005$ ,  $^{\Delta\Delta}p<0,01$ ,  $^{\Delta\Delta\Delta}p<0,001$  frente a DIO-NASH OCA (30 mg/kg).

45

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra la cantidad de genes regulados por las dosis bajas y altas de OCA y MET, solos y en combinación.

50

La Figura 12A es un diagrama de Venn que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y metformina, solos y en combinación, sobre la expresión génica. La Figura 12B es un diagrama de Venn que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión génica. La Figura 12C es un diagrama de Venn que compara la cantidad de genes regulados por dosis bajas y altas de OCA y MET.

55

La Figura 13A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 6a2. La Figura 13B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 4a2. La Figura 13C es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 5a1.

60

Las Figuras 14A-14F describen el efecto sobre el nivel de expresión de ciertos genes regulados únicamente por una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación.  $*p<0,005$  frente al vehículo de control. La Figura 14A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de decorina. La Figura 14B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de la subunidad 1 de lamanina. La Figura 14C es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm del factor 2 de diferenciación de monocitos a macrófagos. La Figura 14D es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm del transcripto del factor de crecimiento transformante B1. La Figura

14E es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 11B. La Figura 14F es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 19.

5 Las Figuras 15A-15C describen el efecto sobre el nivel de expresión de ciertos colágenos regulados por una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación. \*p<0,005 frente al vehículo de control. La Figura 15A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 14a1. La Figura 15B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 6a1.

10

La Figura 15C es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de colágeno tipo 6a2.

15 Las Figuras 16A-16E describen el efecto sobre el nivel de expresión de ciertos genes regulados únicamente por una dosis alta de OCA y MET, solos y en combinación \*p<0,005 frente al vehículo de control. La Figura 16A es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm del receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas. La Figura 16B es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm de decorina. La Figura 16C es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, en el miembro de la subfamilia de colectina de expresión del ARNm 10. La Figura 16D es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión del ARNm del receptor III del factor de crecimiento transformante beta. La Figura 16E es un gráfico de barras que muestra el efecto de una dosis baja de OCA y MET, solos y en combinación, sobre la expresión de ARNm del factor de crecimiento transformante, inducido por beta.

20

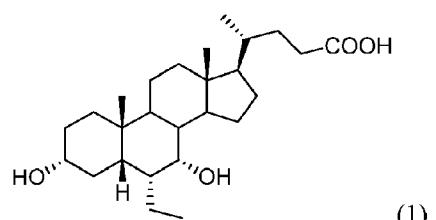
25 Resumen de la divulgación

La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR, al menos un agente terapéutico adicional y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida, en donde el agonista de FXR es el Compuesto 1

30

y en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

35 La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1:



40 o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, al menos un agente terapéutico adicional, y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida, en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

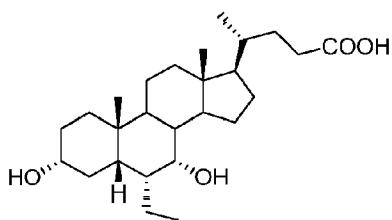
45 La presente solicitud también se refiere a las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos para tratar o prevenir la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que comprende administrar la composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite.

50 Las composiciones y métodos de la presente solicitud abordan las necesidades no satisfechas en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en el que están involucradas concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, disminución de la secreción de insulina y/o disminución de la sensibilidad a la insulina.

Descripción detallada de la invención

55 La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR, al menos un agente terapéutico adicional y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables,

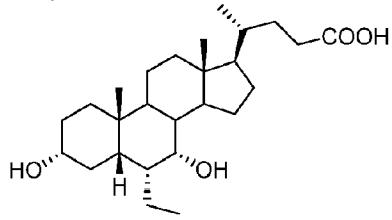
en donde el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida, en donde el agonista de FXR es el Compuesto 1



(1).

y en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

5 La presente solicitud también se dirige a una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1:

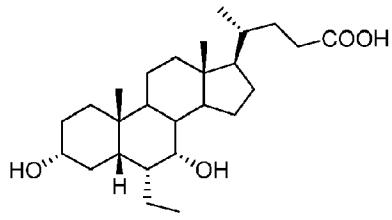


(1).

o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, al menos un agente terapéutico adicional, y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspaglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida, en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

10 El primer compuesto de la composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones es un agonista de FXR que es

15



(1),

o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo.

20 Uno de los problemas a resolver por la presente solicitud es la identificación de terapias de combinación para el tratamiento o prevención de padecimientos relacionados con la concentración elevada de glucosa en la sangre, tales como enfermedades mediadas por FXR (por ejemplo, NAFLD y NASH), hiperglucemia y diabetes, así como para la reducción del nivel de glucosa en la sangre, para el aumento de la secreción de insulina y para el aumento de la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, la presente solicitud identifica terapias de combinación para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por FXR (por ejemplo, NAFLD y NASH) a través de la reducción del nivel de glucosa en la sangre y/o el aumento de la secreción de insulina y/o la sensibilidad a la insulina. En una realización, la enfermedad o padecimiento se trata mediante la activación de FXR. Aunque hay medicamentos disponibles para padecimientos relacionados con el nivel elevado de glucosa, estos medicamentos a menudo no son adecuados para muchos pacientes por una diversidad de razones. Por ejemplo, muchos medicamentos tienen efectos adversos como náuseas, vómitos, 25 diarrea, mareos, dolor de cabeza y debilidad. Algunos medicamentos pueden ser inadecuados para el tratamiento cuando se administran solos. Por ejemplo, en algunas situaciones, un agente estimulante de la secreción de insulina solo es inadecuado para controlar el nivel grave de hiperglucemia que está presente en muchos pacientes (por ejemplo, pacientes con NAFLD o NASH). Algunos fármacos pueden requerir la administración de dosis altas, o una administración más frecuente, debido al metabolismo extenso en metabolitos inactivos o menos potentes. Varias clases de agentes terapéuticos, incluida la liraglutida, se administran mediante inyección. La ventaja de coadministrar por vía oral un segundo agente terapéutico puede conducir a una disminución del número y/o la frecuencia de las inyecciones. Al reducir el número y/o la frecuencia, el régimen de dosificación terapéutica puede permitir un mayor cumplimiento del paciente, especialmente para los pacientes con NASH que pueden no estar acostumbrados a las inyecciones. Las terapias de combinación descritas en la presente pueden resolver los problemas mencionados anteriormente y pueden tener una o más ventajas de, por ejemplo, sinergia, reducción del número de dosis diarias sin que el fármaco pierda eficacia, disminución de la glucosa en sangre en pacientes, potencia mejorada, selectividad, penetración tisular, vida media y/o estabilidad metabólica.

30 En las composiciones farmacéuticas y composiciones farmacéuticas para uso de la presente solicitud, el primer compuesto puede ser el ácido libre o puede ser un conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable (por

ejemplo, conjugado de glicina o taurina). El primer compuesto es un agonista de FXR, que es ácido obeticólico (Compuesto 1). En un ejemplo, el primer compuesto es el ácido libre de un compuesto de fórmula 1. En un ejemplo, el primer compuesto es el conjugado de glicina de un compuesto de fórmula I. En un ejemplo, el primer compuesto es el conjugado de taurina de un compuesto de fórmula I.

5

En las composiciones farmacéuticas y composiciones farmacéuticas para uso de la presente solicitud, el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud también comprenden un primer compuesto marcado isotópicamente o un conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable de este, que tiene una estructura que es idéntica a la del primer compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, un compuesto de fórmula 1), salvo por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que se encuentra más comúnmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos 15 que se pueden incorporar en el primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, flúor, tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^{18}\text{F}$ .

20 El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, por ejemplo, un primer compuesto en el que se incorporan isótopos radiactivos tales como  $^3\text{H}$  y/o  $^{14}\text{C}$ , es útil en ensayos de distribución tisular de fármacos y/o sustratos. Los isótopos valorados, es decir,  $^3\text{H}$ , y carbono-14, es decir,  $^{14}\text{C}$ , se utilizan por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como 25 deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la vida media *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación y, por lo tanto, se puede utilizar en algunas circunstancias. El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo generalmente se puede preparar llevando a cabo los procedimientos descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos de la solicitud, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. En un ejemplo, el ácido obeticólico, o sus sales farmacéuticamente aceptables o conjugados de aminoácidos no están marcados isotópicamente.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir una enfermedad o padecimiento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite.

35 En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es una enfermedad o padecimiento mediado por FXR. Los ejemplos de las enfermedades o padecimientos mediados por FXR incluyen, entre otros, enfermedad hepática tal como una enfermedad o padecimiento colestásico o no colestásico. En una realización, la enfermedad o padecimiento mediado por FXR se refiere a la activación de FXR. Las enfermedades hepáticas colestásicas incluyen, entre otros, cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hipertensión portal, atresia biliar, diarrea de ácidos biliares, daño hepático debido a fibrosis progresiva, fibrosis hepática y enfermedad hepática crónica. Las enfermedades o padecimientos 40 hepáticos no colestásicos incluyen, entre otras, enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, cánceres hepático, gastrointestinal y biliar, como carcinoma hepatocelular, cánceres del conducto biliar, cáncer colorrectal, cánceres gástricos y cánceres renales, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmune; sarcoidosis, enfermedad de 45 Wilson, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X, deficiencia de  $\alpha 1$ -antitripsina, síndrome de Zellweger; tirosinemia, fructosemia, galactosemia, trastorno vascular asociado con el síndrome de Budd-Chiari, enfermedad venooclusiva o trombosis de la vena porta; y fibrosis hepática congénita. Los ejemplos de enfermedades o padecimientos que se pueden tratar mediante la activación de FXR también 50 incluyen hiperglucemia, diabetes, obesidad, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, colesterol LDL alto, colesterol HDL alto, triglicéridos altos y enfermedad cardiovascular.

La NAFLD es un padecimiento médico que se caracteriza por la acumulación de grasa (llamada infiltración grasa) en el hígado. La NAFLD es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y abarca un espectro de padecimientos asociadas con la deposición de lípidos en los hepatocitos. Puede variar desde la esteatosis (hígado graso simple), a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a la fibrosis avanzada y la cirrosis. La enfermedad es en su mayoría 55 silenciosa y a menudo se descubre a través de niveles elevados de enzimas hepáticas. La NAFLD está fuertemente asociada con la obesidad y la resistencia a la insulina y actualmente es considerada por muchos como el componente hepático del síndrome metabólico.

60 La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una padecimiento que causa inflamación y acumulación de tejido graso y fibroso (cicatriz) en el hígado. Los niveles de enzimas hepáticas en la sangre pueden ser más elevados que las elevaciones leves observadas con el hígado graso no alcohólico (HGNA). Aunque pueden ocurrir condiciones similares en personas que abusan del alcohol, la NASH ocurre en aquellos que beben poco o nada de alcohol. La NASH afecta del 2 al 5 por ciento de los estadounidenses y se observa con mayor frecuencia en personas con una o más de las siguientes 65 padecimientos: obesidad, diabetes, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, uso de ciertos medicamentos y exposición a toxinas. La NASH es una causa cada vez más común de enfermedad hepática crónica en todo el mundo y se asocia con

un aumento de la mortalidad relacionada con el hígado y el carcinoma hepatocelular, incluso en ausencia de cirrosis. La NASH progres a cirrosis en el 15-20 % de las personas afectadas y ahora es una de las principales indicaciones para trasplantes de hígado en los Estados Unidos. En la actualidad no existen terapias aprobadas para la NASH.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar en un método para tratar o prevenir la NAFLD o la NASH. En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir la NAFLD o la NASH que están asociadas con un nivel elevado de glucosa en la sangre, disminución de la secreción de insulina y/o disminución de la sensibilidad a la insulina. En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir la NAFLD o la NASH, al menos en parte a través de la 10 reducción del nivel de glucosa en la sangre y/o el aumento de la secreción de insulina y/o la sensibilidad a la insulina. En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar en un método para tratar o prevenir la NASH. En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir la NAFLD que está asociada con un nivel elevado de glucosa en la sangre, disminución de la secreción de insulina y/o disminución de la sensibilidad a la insulina. En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención 15 pueden usarse en un método para tratar o prevenir la NASH, al menos en parte a través de la reducción del nivel de glucosa en la sangre y/o el aumento de la secreción de insulina y/o la sensibilidad a la insulina.

En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento está relacionado con un nivel elevado de glucosa en la sangre, disminución de la secreción de insulina y/o disminución de la sensibilidad a la insulina. Los ejemplos de la enfermedad o padecimiento 20 incluyen, entre otros, enfermedades mediadas por FXR (por ejemplo, NAFLD y NASH), hiperglucemia, diabetes, obesidad y resistencia a la insulina.

En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es una enfermedad mediada por FXR. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es la NAFLD o la NASH. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es NASH.

25 En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es hiperglucemia, diabetes, obesidad o resistencia a la insulina. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es hiperglucemia. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es diabetes. En un ejemplo adicional, la diabetes es diabetes tipo I. En otro ejemplo adicional, la diabetes es diabetes tipo II. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es obesidad. En un ejemplo, la enfermedad o padecimiento es la resistencia a la insulina.

30 35 40 45 50 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir hiperglucemia, diabetes, obesidad o resistencia a la insulina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el sujeto no tiene un padecimiento colestásico. En otro ejemplo, el sujeto tiene un padecimiento colestásico. En un ejemplo, el sujeto no tiene una enfermedad hepática. En un ejemplo, el sujeto tiene una enfermedad hepática. En un ejemplo adicional, la enfermedad hepática se selecciona de una enfermedad hepática colestásica tal como PBC, PSC, hipertensión portal, diarrea por ácidos biliares, daño hepático debido a fibrosis progresiva, fibrosis hepática y enfermedad hepática crónica. En un ejemplo adicional, el sujeto padece PBC, NAFLD o NASH. En un ejemplo adicional, el sujeto padece fibrosis. En otro ejemplo adicional, el sujeto tiene una enfermedad o padecimiento no colestásico, tal como la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, cánceres hepáticos, gastrointestinal y biliar, como carcinoma hepatocelular, cánceres del conducto biliar, cáncer colorrectal, cánceres gástricos y cánceres renales, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmune; sarcoidosis, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X, deficiencia de α1-antitripsina, síndrome de Zellweger; tirosinemia, fructosemia, galactosemia, trastorno vascular asociado con el síndrome de Budd-Chiari, enfermedad venooclusiva o trombosis de la vena porta; y fibrosis hepática congénita.

55 60 65 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para disminuir el nivel de glucosa en la sangre, estimular la secreción de insulina y/o aumentar la sensibilidad a la insulina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el sujeto no tiene un padecimiento colestásico. En otro ejemplo, el sujeto tiene un padecimiento colestásico. En un ejemplo, el sujeto no tiene una enfermedad hepática. En un ejemplo, el sujeto tiene una enfermedad hepática. En un ejemplo adicional, la enfermedad hepática se selecciona de una enfermedad hepática colestásica tal como PBC, PSC, hipertensión portal, diarrea por ácidos biliares, enfermedad hepática crónica, NAFLD, NASH, infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, fibrosis hepática y enfermedad hepática crónica. En un ejemplo adicional, el sujeto padece PBC, NAFLD o NASH. En otro ejemplo adicional, el sujeto tiene fibrosis. En otro ejemplo, el sujeto tiene una enfermedad o padecimiento no colestásico, tal como la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, cánceres hepáticos, gastrointestinal y biliar, como carcinoma hepatocelular, cánceres del conducto biliar, cáncer colorrectal, cánceres gástricos y cánceres renales, fibrosis hepática, enfermedades hepáticas inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmune; sarcoidosis, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X, deficiencia de α1-antitripsina, síndrome de Zellweger; tirosinemia, fructosemia, galactosemia, trastorno vascular asociado con el síndrome de Budd-Chiari, enfermedad venooclusiva o trombosis de la vena porta; y fibrosis hepática congénita.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para inhibir o revertir la fibrosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el sujeto no tiene un padecimiento colestásico. En otro ejemplo, el sujeto tiene un padecimiento colestásico.

5 En un ejemplo, el sujeto al que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud no tiene un padecimiento colestásico asociado con una enfermedad o padecimiento seleccionado del grupo que consiste en cánceres hepáticos y biliares primarios, tales como carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal y cánceres del conducto biliar, cáncer metastásico, sepsis, nutrición parenteral total crónica, fibrosis quística y enfermedad hepática granulomatosa. En un ejemplo, la fibrosis que se va a inhibir o revertir se produce en un órgano donde se expresa FXR.

10 En un ejemplo, un padecimiento colestásico se define por tener un nivel sérico anormalmente elevado de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) y/o 5' nucleotidasa.

15 En otro ejemplo, un padecimiento colestásico se define además como la presentación de al menos un síntoma clínico. En un ejemplo, el síntoma es comezón (prurito). En otro ejemplo, un padecimiento colestásico se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PBS), colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria y colestasis intrahepática del embarazo.

20 En un ejemplo, la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal.

25 En un ejemplo, el sujeto al que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud tiene fibrosis hepática asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas parasitarias; infecciones bacterianas, virales y fúngicas postrasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD); enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); enfermedades hepáticas inducidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida o amiodarona; hepatitis autoinmune; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; trastorno vascular asociado con síndrome de Budd-Chiari, enfermedad venooclusiva o trombosis venosa portal; y fibrosis hepática congénita.

30 En otro ejemplo, el sujeto tiene fibrosis intestinal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis posterior a la radiación y colitis microscópica.

35 En otro ejemplo, el sujeto tiene fibrosis renal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.

40 En otro ejemplo, el sujeto al que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud tiene fibrosis intestinal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis posterior a la radiación y colitis microscópica.

45 En otro ejemplo, el sujeto al que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud tiene fibrosis renal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía crónica por trasplante, nefritis intersticial crónica y enfermedad renal poliquística.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para reducir la cantidad de bilirrubina sérica y/o una o más enzimas hepáticas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite.

55 En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de bilirrubina sérica en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene un nivel elevado de bilirrubina, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina a un nivel normal (por ejemplo, similar al nivel de bilirrubina en un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina por debajo de 10 mg/L, 9 mg/L, 8 mg/L, 7 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,2 mg/L o 1 mg/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina por debajo de 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,2 mg/L o 1 mg/L.

60 En un ejemplo, la enzima hepática se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina (ALP, AP o Alk Phos), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y 5' nucleotidasa. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de una o más enzimas hepáticas en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un

5 sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de una o más enzimas hepáticas, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de una o más enzimas hepáticas (por ejemplo, ALP, ALT, AST, GGT, LDH y 5' nucleotidasa) a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de enzimas hepáticas en un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente).

10 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel sérico de ALP por debajo de 500 UI/L (unidades internacionales por litro), 400 UI/L, 300 UI/L, 200 UI/L, 180 UI/L, 160 UI/L o 150 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALP de aproximadamente 40 UI/L a aproximadamente 150 UI/L.

15 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALT por debajo de 200 UI/L (unidades internacionales por litro), 150 UI/L, 100 UI/L, 80 UI/L, 60 UI/L o 50 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALT de aproximadamente 5 UI/L a aproximadamente 50 UI/L.

20 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de AST por debajo de 200 UI/L (unidades internacionales por litro), 150 UI/L, 100 UI/L, 80 UI/L, 60 UI/L, 50 UI/L o 40 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de AST de aproximadamente 10 UI/L a aproximadamente 50 UI/L.

25 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de GGT por debajo de 200 UI/L (unidades internacionales por litro), 150 UI/L, 100 UI/L, 90 UI/L, 80 UI/L, 70 UI/L o 60 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de GGT de aproximadamente 15 UI/L a aproximadamente 50 UI/L o de aproximadamente 5 UI/L a aproximadamente 30 UI/L.

30 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de LDH por debajo de 500 UI/L (unidades internacionales por litro), 400 UI/L, 300 UI/L, 200 UI/L, 180 UI/L, 160 UI/L, 150 UI/L, 140 UI/L o 130 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de LDH de aproximadamente 120 UI/L a aproximadamente 220 UI/L.

35 En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de 5' nucleotidasa por debajo de 50 UI/L (unidades internacionales por litro), 40 UI/L, 30 UI/L, 20 UI/L, 18 UI/L, 17 UI/L, 16 UI/L, 15 UI/L, 14 UI/L, 13 UI/L, 12 UI/L, 11 UI/L, 10 UI/L, 9 UI/L, 8 UI/L, 7 UI/L, 6 UI/L o 5 UI/L. En un ejemplo adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de 5' nucleotidasa de aproximadamente 2 UI/L a aproximadamente 15 UI/L.

40 En un ejemplo adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para reducir los niveles de glucosa (es decir, la cantidad de glucosa), tal como en la sangre, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el método reduce los niveles de glucosa después de la comida en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de glucosa después de la comida, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa después de la comida a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de glucosa en un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tales como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método reduce los niveles de glucosa en ayunas en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de glucosa en ayunas, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa en ayunas a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de glucosa en un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tales como los descritos en la presente).

45 En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de glucosa, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa después de las comidas por debajo de 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, 350 mg/L, 300 mg/L, 250 mg/L, 240 mg/L, 230 mg/L, 220 mg/L, 210 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L o 150 mg/L. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa después de las comidas por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L o 150 mg/L. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa en ayunas a 70-800 mg/L, 70-700 mg/L, 70-600 mg/L, 70-500 mg/L, 70-400 mg/L, 70-350 mg/L, 70-300 mg/L, 70-250 mg/L, 70-240 mg/L, 70-230 mg/L, 70-220 mg/L, 70-210 mg/L, 70-200 mg/L, 70-190 mg/L, 70-180 mg/L, 70-170 mg/L, 70-160 mg/L, 70-150 mg/L, 70-140 mg/L, 70-130 mg/L, 70-120 mg/L, 70-110 mg/L, 70-100 mg/L, 90-130 mg/L, 90-120 mg/L, 90-110 mg/L o 90-100 mg/L. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de glucosa después de las comidas a 70-200 mg/L, 70-190 mg/L, 70-180 mg/L, 70-170 mg/L, 70-160 mg/L, 70-150 mg/L, 70-140 mg/L, 70-130 mg/L, 70-120 mg/L, 70-110 mg/L, 70-100 mg/L, 90-130 mg/L, 90-120 mg/L, 90-110 mg/L o 90-100 mg/L.

50 En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para reducir los niveles de hemoglobina

5 A1c (HbA1c) (es decir, la cantidad de HbA1c), tal como en la sangre, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el método reduce los niveles de HbA1c en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de HbA1c, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de HbA1c a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de HbA1c en un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente).

10 10 En un ejemplo, el sujeto tiene niveles elevados de HbA1c, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de HbA1c por debajo del 10 %, 9,5 %, 9,0 %, 8,5 %, 8,0 %, 7,5 %, 7,0 %, 6,5 %, 6,4 %, 6,3 %, 6,2 %, 6,1 %, 6,0 %, 5,9 %, 5,8 % o 5,7 %. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de HbA1c por debajo de 8,0 %, 7,9 %, 7,8 %, 7,7 %, 7,6 %, 7,5 %, 7,4 %, 7,3 %, 7,2 %, 7,1 %, 7,0 %, 6,9 %, 6,8 %, 6,7 %, 6,6 %, 15 6,5 %, 6,4 %, 6,3 %, 6,2 %, 6,1 %, 6,0 %, 5,9 %, 5,8 % o 5,7 %. En un ejemplo, el método de la presente solicitud reduce los niveles de HbA1c por debajo de 6,5 %, 6,4 %, 6,3 %, 6,2 %, 6,1 %, 6,0 %, 5,9 %, 5,8 % o 5,7 %.

20 Las composiciones farmacéuticas de la pueden ser útiles en un método para aumentar la secreción de insulina (es decir, la cantidad de insulina), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el método de la presente solicitud aumenta la secreción de insulina en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene una secreción disminuida de insulina, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente). En un ejemplo, el método de la presente solicitud aumenta la secreción de insulina de modo que el nivel de insulina es de 2-9,0 mUI/mL, 2-8,9 mUI/mL, 2-8,8 mUI/mL, 2-8,7 mUI/mL, 2-8,6 mUI/mL, 2-8,5 mUI/mL, 2-8,4 mUI/mL, 2-8,3 mUI/mL, 2-8,2 mUI/mL, 2-8,1 mUI/mL, 2-8,0 mUI/mL, 2-7,9 mUI/mL, 2-7,8 mUI/mL, 2-7,7 mUI/mL, 2-7,6 mUI/mL, 2-7,5 mUI/mL, 2-7,4 mUI/mL, 2-7,3 mUI/mL, 2-7,2 mUI/mL, 2-7,1 mUI/mL, 2-7,0 mUI/mL, 2-6,9 mUI/mL, 2-6,8 mUI/mL, 2-6,7 mUI/mL, 2-6,6 mUI/mL, 2-6,5 mUI/mL, 2-6,4 mUI/mL, 2-6,3 mUI/mL, 2-6,2 mUI/mL, 2-6,1 mUI/mL, 2-6,0 mUI/mL, 3-9,0 mUI/mL, 3-8,9 mUI/mL, 3-8,8 mUI/mL, 3-8,7 mUI/mL, 3-8,6 mUI/mL, 3-8,5 mUI/mL, 3-8,4 mUI/mL, 3-8,3 mUI/mL, 3-8,2 mUI/mL, 3-8,1 mUI/mL, 3-8,0 mUI/mL, 3-7,9 mUI/mL, 3-7,8 mUI/mL, 3-7,7 mUI/mL, 3-7,6 mUI/mL, 3-7,5 mUI/mL, 3-7,4 mUI/mL, 3-7,3 mUI/mL, 3-7,2 mUI/mL, 3-7,1 mUI/mL, 3-7,0 mUI/mL, 3-6,9 mUI/mL, 3-6,8 mUI/mL, 3-6,7 mUI/mL, 3-6,6 mUI/mL, 3-6,5 mUI/mL, 3-6,4 mUI/mL, 3-6,3 mUI/mL, 3-6,2 mUI/mL, 3-6,1 mUI/mL, 3-6,0 mUI/mL, 4-9,0 mUI/mL, 4-8,9 mUI/mL, 4-8,8 mUI/mL, 4-8,7 mUI/mL, 4-8,6 mUI/mL, 4-8,5 mUI/mL, 4-8,4 mUI/mL, 4-8,3 mUI/mL, 4-8,2 mUI/mL, 4-8,1 mUI/mL, 4-8,0 mUI/mL, 4-7,9 mUI/mL, 4-7,8 mUI/mL, 4-7,7 mUI/mL, 4-7,6 mUI/mL, 4-7,5 mUI/mL, 4-7,4 mUI/mL, 4-7,3 mUI/mL, 4-7,2 mUI/mL, 4-7,1 mUI/mL, 4-7,0 mUI/mL, 4-6,9 mUI/mL, 4-6,8 mUI/mL, 4-6,7 mUI/mL, 4-6,6 mUI/mL, 4-6,5 mUI/mL, 4-6,4 mUI/mL, 4-6,3 mUI/mL, 4-6,2 mUI/mL, 4-6,1 mUI/mL, 4-6,0 mUI/mL, 5-9,0 mUI/mL, 5-8,9 mUI/mL, 5-8,8 mUI/mL, 5-8,7 mUI/mL, 5-8,6 mUI/mL, 5-8,5 mUI/mL, 5-8,4 mUI/mL, 5-8,3 mUI/mL, 5-8,2 mUI/mL, 5-8,1 mUI/mL, 5-8,0 mUI/mL, 5-7,9 mUI/mL, 5-7,8 mUI/mL, 5-7,7 mUI/mL, 5-7,6 mUI/mL, 5-7,5 mUI/mL, 5-7,4 mUI/mL, 5-7,3 mUI/mL, 5-7,2 mUI/mL, 5-7,1 mUI/mL, 40 5-7,0 mUI/mL, 5-6,9 mUI/mL, 5-6,8 mUI/mL, 5-6,7 mUI/mL, 5-6,6 mUI/mL, 5-6,5 mUI/mL, 5-6,4 mUI/mL, 5-6,3 mUI/mL, 5-6,2 mUI/mL, 5-6,1 mUI/mL o 5-6,0 mUI/mL.

45 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles en un método para aumentar la sensibilidad a la glucosa (es decir, disminuir la resistencia a la insulina), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente solicitud a un sujeto que lo necesite. En un ejemplo, el método de la presente solicitud aumenta la sensibilidad a la insulina (es decir, disminuye la resistencia a la insulina) en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un sujeto de control (por ejemplo, un sujeto al que no se le administra la composición de la presente solicitud). En un ejemplo, el sujeto tiene sensibilidad a la insulina disminuida (es decir, resistencia a la insulina aumentada), en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo sin una enfermedad o padecimiento, tal como los descritos en la presente).

50 La sensibilidad a la insulina se refiere a la sensibilidad del cuerpo a los efectos de la insulina. Una persona que se dice que es sensible a la insulina requerirá cantidades más pequeñas de insulina para reducir los niveles de glucosa en sangre que alguien que tiene baja sensibilidad.

55 55 La resistencia a la insulina (IR) es un padecimiento fisiológico en el que las células, tejidos u órganos no responden a las acciones normales de la insulina. Por consiguiente, las células, tejidos u órganos en el cuerpo se vuelven resistentes a la insulina y no pueden usar la insulina tan eficazmente como las células, tejidos u órganos normales (por ejemplo, células, tejidos u órganos en un sujeto sano).

60 60 En un ejemplo, el sujeto es un mamífero. En un ejemplo, el mamífero es humano.

65 En un ejemplo, el primer compuesto y un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran en una combinación bidireccional. En otro ejemplo, el primer compuesto y dos o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran en una combinación bidireccional.

El primer compuesto, junto con por lo menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) puede lograr efectos sinérgicos, tales como reducciones sinérgicas en los niveles de glucosa, niveles de HbA1c y/o resistencia a la insulina, que pueden ser resistentes a terapias individuales. Por lo tanto, una combinación del primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) es ventajosa. Puede ser particularmente ventajoso que tal combinación del primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se proporcione en una única composición farmacéutica con un portador farmacéuticamente aceptable (tal como en una forma de cápsula única) diseñado para aumentar el cumplimiento y, por lo tanto, la eficacia. Por consiguiente, la presente solicitud proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del primer compuesto y una cantidad eficaz del al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente), junto con uno o más portadores, diluyentes, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables, como se define en las reivindicaciones.

En un ejemplo, el primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran simultáneamente. Por ejemplo, el primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran juntos en una única composición farmacéutica con un portador farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, un primer compuesto (agonista de FXR) o un conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable del mismo que se administra en una cantidad total diaria de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg o 5-25 mg durante un primer período de tiempo, seguido de la administración del segundo compuesto (al menos un agente terapéutico adicional) en una cantidad total diaria de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg o 5-25 mg. En un ejemplo, la cantidad total se administra por vía oral una vez al día. En un ejemplo, la primera dosis es diferente de la segunda dosis. En un ejemplo adicional, la primera dosis es menor que la segunda dosis. En otro ejemplo, la primera dosis es más alta que la segunda dosis. En un ejemplo, la primera dosis es de aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 4,8 mg a 5,2 mg), y la segunda dosis es de aproximadamente 10 mg (por ejemplo, de 9,8 mg a 10,2 mg). En un ejemplo, el primer período de tiempo es de aproximadamente 6 meses. En un ejemplo, el segundo período de tiempo es de aproximadamente 6 meses.

30 La composición farmacéutica se administra por vía oral.

Una composición de acuerdo con la presente solicitud contendrá típicamente suficiente primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) para permitir que la dosis diaria deseada de cada uno se administre a un sujeto que lo necesite en una forma de dosis unitaria única, tal como un comprimido o cápsula, o en dos o más formas de dosis unitaria que se administrarán simultáneamente o a intervalos durante un día.

En los métodos de la presente solicitud, las sustancias activas pueden administrarse en dosis diarias únicas, o en dos, tres, cuatro o más dosis divididas idénticas o diferentes por día, y pueden administrarse simultáneamente o en diferentes momentos durante el día. Por lo general, las sustancias activas se administrarán simultáneamente, más generalmente en una sola forma de dosificación combinada.

En un aspecto, el primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran en dosificaciones sustancialmente iguales a las dosificaciones a las que se administran en las monoterapias respectivas. En un aspecto, el primer compuesto se administra a una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90 %, menor que 80 %, menor que 70 %, menor que 60 %, menor que 50, menor que 40 %, menor que 30 %, menor que 20 % o menor que 10 %) su dosificación de monoterapia. En un aspecto, el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administra a una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que el 90 %, menor que el 80 %, menor que el 70 %, menor que el 60 %, menor que el 50, menor que el 40 %, menor que el 30 %, menor que el 20 % o menor que el 10 %) su dosificación de monoterapia. En un aspecto, tanto el primer compuesto como el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se administran a una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90 %, menor que 80 %, menor que 70 %, menor que 60 %, menor que 50, menor que 40 %, menor que 30 %, menor que 20 % o menor que 10 %) sus respectivas dosificaciones de monoterapia.

55 Una composición farmacéutica de la presente solicitud puede estar en cualquier forma conveniente para la administración oral, tal como un comprimido, cápsula, polvo, pastilla, píldora, trocisco, elixir, polvo liofilizado, solución, gránulo, suspensión, emulsión, jarabe o tintura. También se pueden preparar formas de liberación lenta o liberación retardada, por ejemplo, en forma de partículas recubiertas, comprimidos multicapa, cápsulas dentro de cápsulas, comprimidos dentro de cápsulas o microgránulos.

60 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes, edulcorantes, agentes disgregantes, diluyentes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardantes farmacéuticamente aceptables. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa,

polivinilpirrolidona, goma xantana, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros o ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes retardantes adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

5 Las formas líquidas para administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un portador líquido. Los portadores líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maní, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

10 Las suspensiones para administración oral pueden incluir además agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o alcohol cetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono o di-oleato, -estearato o laurato de polioxetilensorbitol, mono o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxetilensorbitano y similares.

15 20 Las emulsiones para administración oral pueden incluir además uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes dispersantes como se ejemplificó anteriormente o gomas naturales tales como goma arábiga o goma tragacanto.

25 30 35 40 45 50 Las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud se pueden preparar mezclando, moliendo, homogeneizando, suspendiendo, disolviendo, emulsionando, dispersando y/o mezclando el primer compuesto o su conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable y al menos un agente terapéutico adicional, junto con los excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) seleccionados. Un tipo de composición farmacéutica de la presente solicitud en forma de un comprimido o cápsula se puede preparar mediante (a) la preparación de un primer comprimido que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo y al menos un agente terapéutico adicional junto con cualquier excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) mediante la preparación de un segundo comprimido o cápsula, en donde el segundo comprimido o cápsula incluye la(s) sustancia(s) activa(s) restante(s) y el primer comprimido. Otro tipo de composición farmacéutica de la presente solicitud en forma de cápsula se puede preparar mediante (a) la preparación de una primera cápsula que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo y el agente o agentes terapéuticos adicionales, junto con cualquier excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) mediante la preparación de una segunda cápsula, en donde la segunda cápsula incluye la(s) sustancia(s) activa(s) restante(s) y la primera cápsula. Un tipo adicional de composición farmacéutica de la presente solicitud en forma de un comprimido puede prepararse (a) mediante la preparación de una cápsula que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas de un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo y al menos un agente terapéutico adicional, junto con cualquier excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) mediante la preparación de un comprimido, en donde el comprimido incluye la(s) sustancia(s) activa(s) restante(s) y la cápsula.

55 60 En ejemplos, el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se usa como un comprimido de liberación inmediata o como un comprimido de liberación sostenida. Es particularmente eficaz cuando se proporciona en un comprimido de liberación sostenida. Los comprimidos de liberación sostenida de los diversos agentes terapéuticos adicionales están disponibles comercialmente. Es preferible para una acción prolongada que el comprimido esté en un formato de liberación sostenida.

En otro ejemplo, la composición farmacéutica de la presente solicitud comprende una cápsula que contiene al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) dentro de una cápsula que contiene un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo. Típicamente, en esta forma, el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) se presenta en una forma de liberación inmediata. En ese caso, es habitual administrar la composición tres veces al día. Otro modo de administración es proporcionar una composición que contiene al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) en una forma de liberación sostenida o una forma de liberación no sostenida como se describió anteriormente, dos veces al día, en donde la cantidad diaria de la composición administrada contiene suficiente cantidad de las sustancias activas para proporcionar la dosificación diaria deseada al paciente.

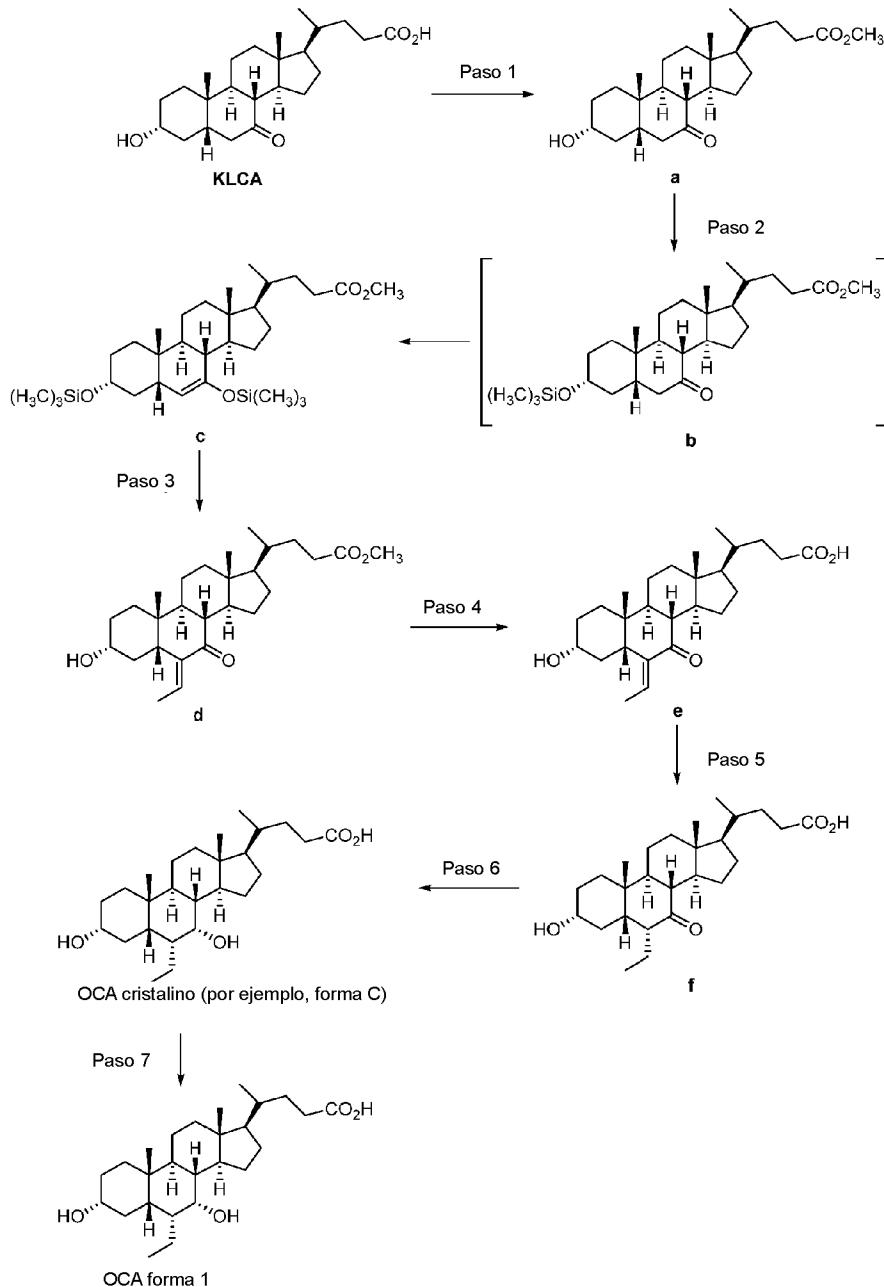
65 En un ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la solicitud son una forma de dosificación que comprende un primer compuesto o un conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable de este en una cantidad total diaria de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg o 5-25 mg.

La composición farmacéutica de la presente solicitud puede ser utilizada de por vida por el paciente y prolongar la supervivencia. La reducción de la glucosa en la sangre, el aumento de la secreción de insulina y/o la disminución de la resistencia a la insulina aseguran la reducción en el desarrollo de enfermedades asociadas, como la diabetes y la obesidad. Es probable que la combinación del primer compuesto y el al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente) sea la terapia de elección para la cirrosis biliar primaria (PBC) con hiperglucemia y para la cirrosis biliar primaria resistente (PBC). Debido a la dosificación simplificada proporcionada por la presente solicitud, se puede utilizar una terapia combinada de la presente solicitud en dosis crecientes, dependiendo del peso y la respuesta clínica del paciente.

5 Los primeros compuestos descritos en la presente se pueden preparar mediante los métodos convencionales (por ejemplo, aquellos descritos en la publicación de EE. UU. No. 2009/0062526, la publicación de EE. UU. No., y el documento WO 2006/122977), tal como mediante una síntesis de 6 etapas seguida de una etapa de purificación para producir el Compuesto 1 altamente puro (ácido obeticólico u OCA) como se muestra a continuación en el Esquema 1.

10

Esquema 1



15

El proceso anterior se describió en el documento WO 2013/192097. El proceso es una síntesis de 6 etapas seguida de una etapa de purificación. La etapa 1 es la esterificación del ácido carboxílico C-24 del ácido 7-ceto-litocólico (KLCA) usando metanol en presencia de catálisis ácida y calor para producir el compuesto de éster metílico a. La etapa 2 es la

5 formación de éter de silileno a partir del compuesto 1 usando una base fuerte seguido de tratamiento con clorosilano para producir el compuesto c. El paso 3 es una reacción de condensación aldólica del compuesto de éter de silileno c y acetaldehído para producir el compuesto d. La etapa 4 es la saponificación del éster metílico C-24 del compuesto d para producir el compuesto e. La etapa 5 es la hidrogenación del resto 6-etylido del compuesto e para producir el compuesto f. La etapa 6 es la reducción selectiva del grupo 7-ceto del compuesto f a un grupo 7a-hidroxi para producir el Compuesto 1 cristalino. La Etapa 7 es la conversión del compuesto cristalino en el Compuesto 1 (Forma 1 de ácido obeticólico o Forma 1 de OCA).

10 Las actividades biológicas y/o terapéuticas de la composición farmacéutica de la presente solicitud se pueden medir mediante los métodos convencionales conocidos en la técnica. Sin limitar la descripción de la presente solicitud, en la presente se proporcionan algunos métodos adecuados.

*Aislamiento de hepatocitos*

15 20 Se puede utilizar un método de perfusión de colagenasa *in situ* de dos pasos para aislar los hepatocitos. Los hepatocitos se aíslan de un animal adecuado (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo). Después de una perfusión adecuada, el hígado se disecciona y se transfiere a un tampón de perfusión. La suspensión celular resultante se filtra y se recoge. Los hepatocitos se separan (por ejemplo, mediante el uso de una técnica de centrifugación de densidad Percoll).

25 20 *Cultivo intercalado de hepatocitos*

Los hepatocitos aislados se cultivaron en placas de cultivo tisular recubiertas de colágeno y se mantienen en medio de cultivo suplementado con suero, penicilina, estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico, insulina, glucagón e hidrocortisona. Para el sistema intercalado, se distribuye una solución adicional de gel de colágeno sobre las células. Las 25 placas de cultivo se incuban a 37 °C para permitir la gelificación y la unión de la segunda capa de gel. El medio de cultivo se cambia diariamente y se almacena a -20 °C para su posterior análisis. La composición farmacéutica de la presente solicitud se aplica a los hepatocitos y posteriormente se miden los efectos sobre las células.

30 30 *Cultivos en suspensión de hepatocitos*

Inmediatamente después del aislamiento, los hepatocitos se lavan y se vuelven a suspender. Las células suspendidas se cultivaron en ausencia o presencia de la composición farmacéutica de la presente solicitud. Se pueden incluir controles positivos (por ejemplo, células cultivadas en presencia de glucagón).

35 35 Después del período de incubación, se determinará la glucosa liberada en el medio (por ejemplo, con el método de glucosa-oxidasa usando un kit de ensayo Trinder (Sigma)).

Además, la utilización de glucosa se puede determinar como la producción de agua tritiada (como para los experimentos de oxidación de ácidos grasos) después de la incubación de hepatocitos en presencia de [5-<sup>3</sup>H]-glucosa. La captación de 40 40 2-[<sup>3</sup>H]-desoxiglucosa se determina con o sin insulina (Perdomo *et al.*, J. Biol. Chem. 279, 27177 (2004)). La incorporación de D-[<sup>14</sup>C]-glucosa en el glucógeno se puede medir en ausencia o presencia de insulina (Perdomo *et al.* 2004).

50 50 *Cultivo celular HepG2*

45 55 Las células de hepatoblastoma humano (HepG2) se cultivaron en medio de cultivo como se describe (Wang *et al.*, Mol. Endocrinol. 22, 1622 (2008)). Al día siguiente, las células se tratan con la composición farmacéutica de la presente solicitud. Después del tratamiento, las células se tratan con TPA, LPS o TNF- $\alpha$ , y luego se recolectan para el aislamiento de ARN.

50 60 Se realizará la transfección transitoria de células HepG2 (*por ejemplo*, mediante el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se pretratan con la composición farmacéutica de la presente solicitud. Las células se tratan posteriormente con o sin LPS o TPA. Posteriormente, las células se cosecharon y se determinó la actividad de luciferasa utilizando un sistema de ensayo indicador de luciferasa dual.

55 65 *Modelo en ratones*

Los ratones (por ejemplo, de tipo silvestre o FXR<sup>-/-</sup>) se mantuvieron en una instalación animal libre de patógenos bajo un estándar 12: Ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se dio a los ratones alimento estándar para roedores y agua *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche y despues se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis única de LPS, o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o la composición farmacéutica de la presente solicitud, seguido de ingesta de agua *ad libitum*. Después de la inyección, los ratones se sacrifican y se extrajeron sangre e hígado para su posterior análisis. Todos los procedimientos siguieron las pautas de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

65 *Modelo de MetS en conejos*

El modelo de conejo inducido por HFD de MetS se obtiene como se describió anteriormente (Filippi *et al.*, J. Sexual Med. 6, 3274 (2009)). Los conejos blancos machos de Nueva Zelanda se numeran aleatoriamente y se asignan a dos grupos diferentes: grupo no tratado, alimentado con una dieta de control (CON) o grupo tratado, alimentado con un HFD (por ejemplo, 0,5 % de colesterol y 4 % de aceite de maní), durante 12 semanas. Un subgrupo de conejos HFD se sometió a 5 tratamiento con la composición farmacéutica de la presente solicitud.

Se obtuvieron muestras de sangre al inicio del estudio y en la semana 12. Después de 12 semanas de tratamiento, los conejos fueron sacrificados y se extirparon, pesaron, recogieron y procesaron las muestras del hígado, el VAT (acumulado entre las asas intestinales y el mesenterio) y la vesícula biliar para los análisis posteriores. También se procesaron 10 muestras de VAT de todos los grupos de conejos para el aislamiento de preadipocitos. Los análisis séricos bioquímicos y hormonales se realizaron según se describió anteriormente (Filippi *et al.* 2009, Morelli *et al.*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 132, 80 (2012), Vignozzi *et al.*, J. Endocrinology 212, 71 (2012)).

Para evaluar los efectos de MetS, se diseñó un algoritmo que tomó en cuenta la presencia, como variable ficticia, de uno 15 o más de los siguientes factores: hiperglucemia, niveles altos de triglicéridos, niveles altos de colesterol, aumento de la presión arterial y acumulación de grasa visceral. Los puntos de corte para cada factor se derivan de la media ± 2 DE del parámetro analizado, medido en los conejos CON. La positividad para tres o más factores indica MetS.

#### 20 *Análisis histomorfométrico del VAT*

Las muestras de VAT se analizaron mediante tinción con hematoxilina y eosina para medir el diámetro de los adipocitos, como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012).

#### 25 *Detección de hipoxia e inmunohistoquímica*

La oxigenación de VAT se analiza utilizando el fármaco biorreductor clorhidrato de pimonidazol, inyectado i. p. antes de 30 matar, como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012, Morelli *et al.* 2012, 2013, Vignozzi *et al.* 2012).

#### 35 *Preparación total y de fracciones de membrana/citosólicas*

Para la extracción de proteínas de las muestras de VAT, los tejidos congelados se molieron en nitrógeno líquido y se dividieron en dos alícuotas: una para la extracción total de proteínas y la otra para las preparaciones de membrana/citosólicas. Se prepararon fracciones de membrana y citosólicas. Los extractos de proteínas se cuantificaron con el reactivo BCA (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.) y se resolvieron mediante SDS-PAGE. El análisis de transferencia tipo Western se realizó como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012).

#### 30 *Histología hepática*

La esteatosis hepática se evaluó mediante tinción con Oil Red O de las secciones hepáticas. Las secciones congeladas 40 se cortaron en un criostato y se fijaron tiñeron con Oil Red O. Después de la tinción con Oil Red O, las secciones se lavaron y tiñeron con hematoxilina y eosina para resaltar los núcleos de los hepatocitos. Finalmente, se fotografiaron las secciones y se realizó la cuantificación asistida por computadora de la positividad de Oil Red O después de restar el fondo utilizando el software Adobe Photoshop.

#### 45 *Inmunohistoquímica para marcadores inflamatorios en las secciones hepáticas*

Las secciones hepáticas se incubaron con anticuerpos primarios contra varios marcadores inflamatorios (por ejemplo, TNF $\alpha$ , Cd68, II-6, II-1b e II-12). Las secciones se enjuagaron y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado y 50 después con un complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa. El producto de reacción se desarrolló con tetrahidrocloruro de 3',3'-diaminobencidina como cromógeno (Sigma-Aldrich). Los experimentos de control se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. La cuantificación asistida por computadora de la tinción contra marcadores inflamatorios se realizó después de la sustracción de fondo utilizando el software Adobe Photoshop.

#### 55 *Aislamiento, caracterización y diferenciación de preadipocitos de grasa visceral de conejo*

El aislamiento de preadipocitos de conejo (rPAD) del VAT se llevó a cabo como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). Las células se cultivaron en un medio de cultivo completo. Se utilizan cultivos P1. Los rPAD se caracterizaron 60 por citometría de flujo con varios anticuerpos monoclonales (por ejemplo, CD34-PE, CD45-FITC, CD31-FITC, CD14-PE, CD90-PE, CD106-FITC, y CD105-PE, como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). La diferenciación de rPAD, 2 días después de la confluencia, se indujo exponiéndolos a una mezcla de diferenciación (DIM) (por ejemplo, una mezcla que contenía 5 mg/ml de insulina, dexametasona 1 mM y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX) en DMEM complementado con FBS separado al 5 %).

#### 65 *Captación de glucosa*

La captación de glucosa por rPAD se midió como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). Los rPAD expuestos

5 a DIM se cultivaron durante 24 h en un medio libre de suero, seguido de incubación en concentraciones crecientes de insulina para evaluar la estimulación dependiente de insulina. Al final del período de incubación, los rPAD se incubaron adicionalmente con  $^3\text{H}$ -2-desoxi-D-glucosa. La radiactividad incorporada se midió mediante el uso de espectrometría de centelleo.

10 *Animales de experimentación y dietas*

15 Los animales se alojaron de forma individual en jaulas estándar a 22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Los ratones se pueden comprar (por ejemplo, en The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME)). Los ratones macho con deficiencia del receptor de GLP-1 (GLP-1RKO) se derivan de pares de apareamiento de heterocigotos (Scrocchi *et al.*, Nat. Med. 2, 1254 (1996)). Para inducir NASH, se prueban dos dietas compuestas por alimento alto en grasas, alto en fructosa y alto en colesterol, donde la fuente de grasa sería grasas trans o manteca de cerdo. Como dieta de control se utilizó una dieta baja en grasas sin fructosa ni colesterol.

20 *15 Estudios y administración de fármacos*

25 Para caracterizar el desarrollo de NASH, se mantuvo a los ratones *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* o B6, ya sea una dieta baja en grasas (LFD), la dieta alta en grasas trans, alta en fructosa, alta en colesterol (HTF) o la dieta alta en grasa de cerdo, alta en fructosa, alta en colesterol (HLF) (por ejemplo, durante 8 o 12 semanas). Los ratones se implantan por vía subcutánea con una única minibomba osmótica que suministraba vehículo (por ejemplo, DMSO al 50 % en agua estéril) o una composición farmacéutica de la presente solicitud. Además o alternativamente, los ratones podían tener vehículo o una composición farmacéutica de la presente solicitud administrada una vez al día mediante sonda oral.

30 35 Para evaluar el impacto de la pérdida de peso corporal en los criterios de valoración hepáticos, se puede repetir el estudio inicial en ratones *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* expuestos a dieta LFD o HTF como se describió anteriormente. Después de 8 semanas con dieta LFD o HTF, a todos los ratones se les implantó una minibomba osmótica que administraba el vehículo o una composición farmacéutica de la presente solicitud. Además o alternativamente, los ratones podían tener vehículo o una composición farmacéutica de la presente solicitud administrada una vez al día otras vías de administración, tal como sonda oral. Un subconjunto del grupo de HTF se implanta con un vehículo que contiene minibomba y con restricción calórica para provocar un grado similar de pérdida de peso al observado en ratones tratados con el fármaco.

40 *Análisis histológicos y bioquímicos del tejido hepático*

45 Al finalizar, el tejido hepático se extirpa y se fija (por ejemplo, en formalina tamponada neutra al 10 %). El tejido hepático se incorporó en parafina, seccionó, montó y tiñó con hematoxilina y eosina. Para visualizar la fibrosis, se tiñe otro conjunto de secciones con tinción tricrómica de Masson. Las secciones se tiñen primero con hematoxilina de hierro de Weigert, seguido de escarlata de Biebrich, ácido fosfotungstico/fosfomolíbdico y tratamiento con azul de anilina. Un segundo conjunto de secciones se inmunotíñó usando un anticuerpo dirigido al marcador de macrófagos Mac-2. Todos los análisis histológicos son realizados por un patólogo ciego a las condiciones de tratamiento.

40 *40 Análisis de hormonas y metabolitos en plasma*

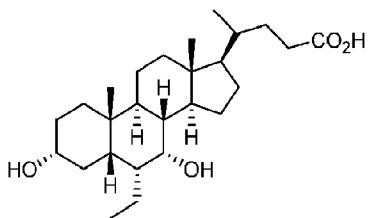
45 Se midieron los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total, ALT y aspartato aminotransferasa (AST) (por ejemplo, mediante el uso de un bioanalizador Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Center Valley, PA)). Las muestras de plasma se diluyeron 1: 10 con PBS para la detección de ALT y AST dentro del rango de la curva estándar. La adiponectina plasmática total se mide (por ejemplo, mediante el uso de un ELISA disponible comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA)).

50 *Definiciones*

50 Por conveniencia, ciertos términos utilizados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se recopilan aquí.

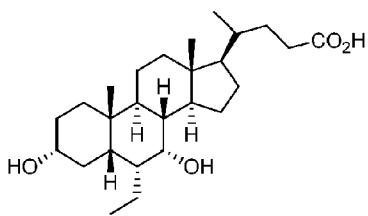
55 Tal como se usa en la presente, el término "agonista de FXR" se refiere a cualquier compuesto que activa FXR. En un aspecto, un agonista de FXR logra al menos 50 % de activación de FXR con respecto a CDCA, el control positivo apropiado en los métodos de ensayo descritos en el documento WO 2000/037077. En otro aspecto, un agonista de FXR logra el 100 % de activación de FXR en el ensayo de proximidad de centelleo o el ensayo HTRF como se describe en el documento WO2000/037077. Los ejemplos de agonistas de FXR incluyen, entre otros, los descritos en los documentos de EE. UU. 7,138,390; 7,932,244; 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; y 20020120137.

65 Tal como se usa en la presente, el término "ácido obeticólico" u "OCA" se refiere a un compuesto que tiene la estructura química:



5 El ácido obeticólico también se conoce como ácido obeticólico Forma 1, INT-747, ácido 3a,7a-dihidroxi-6a-ethyl-5b-colan-24-oico, ácido 6a-ethyl-quenodesoxicólico, 6-ethyl-CDCA, 6ECDCA, ácido colan-24-oico, 6-ethyl-3,7-dihidroxi-(3a,5b,6a,7a), y se puede preparar mediante los métodos descritos en la publicación de EE. UU. No. 2009/0062526 A1, la publicación de EE. UU. No. 7,138,390 y el documento WO2006/122977. El número de registro CAS para el ácido obeticólico es 459789-99-2.

10 Tal como se usa en la presente, el término "ácido obeticólico cristalino" se refiere a cualquier forma cristalina de un compuesto que tiene la estructura química:



15 El ácido obeticólico cristalino significa que el compuesto se cristaliza en una disposición específica de empaquetamiento de cristales en tres dimensiones espaciales o que el compuesto tiene planos de caras externas. La forma sólida del ácido obeticólico puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino, todas las cuales tienen la misma composición elemental del ácido obeticólico. Las diferentes formas cristalinas generalmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectral infrarrojo, puntos de fusión, dureza de densidad, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El solvente de recristalización, la velocidad de cristalización, la temperatura de almacenamiento y otros factores pueden hacer que domine una forma cristalina. Los cristales de ácido obeticólico se 20 pueden preparar mediante cristalización en diferentes condiciones, por ejemplo, diferentes disolventes, temperaturas, etc. Se describen ejemplos de formas cristalinas de OCA en la publicación de EE. UU. en tramitación junto con la presente No. 20130345188.

25 El término "primer compuesto" significa un compuesto de fórmula I o Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos de este. Siempre que el término se use en el contexto de la presente solicitud, debe entenderse que la referencia se hace a la base libre, un compuesto marcado isotópicamente, un compuesto cristalino o una sal farmacéuticamente aceptable correspondiente o conjugado de aminoácidos del mismo, siempre que sea posible y/o apropiado según las circunstancias.

30 30 Tal como se usa en la presente, el término "conjugados de aminoácidos" se refiere a conjugados de un primer compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I) con cualquier aminoácido adecuado. Por ejemplo, dicho conjugado de aminoácidos adecuado de un compuesto de Fórmula I tendrá la ventaja adicional de una mayor integridad en los fluidos biliares o intestinales. Los aminoácidos adecuados incluyen, entre otros, glicina, sarcosina y taurina. Por lo tanto, la presente solicitud abarca los conjugados de glicina, sarcosina y taurina de un primer compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, el Compuesto 1).

40 "Tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular o eliminar, que resulte en la mejora de la padecimiento, enfermedad, trastorno, etc. "Tratar" o "tratamiento" de un estado de enfermedad incluye: inhibir el estado de enfermedad, es decir, detener el desarrollo del estado de enfermedad o sus síntomas clínicos, o aliviar el estado de enfermedad, es decir, causar una regresión temporal o permanente del estado de enfermedad o sus síntomas clínicos.

45 "Prevenir" el estado de enfermedad incluye hacer que los síntomas clínicos del estado de enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto o predisposto al estado de enfermedad, pero que aún no experimenta o muestra síntomas del estado de enfermedad.

50 El término "inhibir" o "inhibición", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier efecto positivo detectable sobre el desarrollo o la progresión de una enfermedad o padecimiento. Tal efecto positivo puede incluir el retraso o la prevención de la aparición de al menos un síntoma o signo de la enfermedad o padecimiento, el alivio o la reversión de los síntomas o signos, y la ralentización o prevención del empeoramiento adicional de los síntomas o signos.

"Estado de enfermedad" significa cualquier enfermedad, trastorno, padecimiento, síntoma o indicación.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente, se refiere a una cantidad de un primer compuesto (por ejemplo, un ligando activador de FXR), o al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente), que produce un efecto terapéutico agudo o crónico tras la administración de la dosis apropiada, solo o en combinación. En un ejemplo, una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer compuesto (por ejemplo, un ligando activador de FXR) produce un efecto terapéutico agudo o crónico tras la administración de la dosis adecuada en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente). El efecto incluye la prevención, corrección, inhibición o reversión de los síntomas, signos y patología subyacente de una enfermedad/padecimiento (por ejemplo, fibrosis del hígado, riñón o intestino) y complicaciones relacionadas en cualquier medida detectable. Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del primer compuesto, el agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente), la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer compuesto se puede formular junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente), y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables para la administración a un ser humano o un animal no humano. Por consiguiente, la composición farmacéutica de la solicitud se puede administrar, por ejemplo, por vía oral, parenteral o tópica, para proporcionar una cantidad eficaz del primer compuesto y los agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente). En ejemplos alternativos, las composiciones de la solicitud se pueden usar para recubrir o impregnar un dispositivo médico, por ejemplo, una endoprótesis vascular (stent).

"Efecto farmacológico", como se usa en la presente, abarca los efectos producidos en el sujeto que logran el propósito previsto de una terapia. En un ejemplo, un efecto farmacológico significa que las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquel que resulta en la prevención, alivio o reducción de las indicaciones primarias en un sujeto tratado. En un ejemplo, un efecto farmacológico significa que los padecimientos y síntomas de las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando se previenen, alivian o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquel que resulta en la prevención, alivio o reducción de los trastornos o síntomas en un sujeto tratado.

30 Debe entenderse que los isómeros que proceden de dicha asimetría (por ejemplo, todos los enantiómeros y diastereómeros) están incluidos dentro del alcance de esta invención, a menos que se indique lo contrario. Tales isómeros se pueden obtener en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis estereoquímicamente controlada.

35 Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene agentes terapéuticos tales como un primer compuesto y al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales descritos en la presente), en una forma adecuada para la administración a un sujeto. En un ejemplo, la composición farmacéutica está a granel o en forma de dosis unitaria. Puede ser ventajoso formular composiciones en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosis unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de reactivo activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosis de la solicitud está dictada por y depende directamente de las características únicas de los agentes activos y el efecto terapéutico particular a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal agente activo para el tratamiento de individuos.

45 45 El término "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado como se describe en la presente.

50 La forma de dosis unitaria es cualquiera de una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una sola bomba en un inhalador de aerosol o un vial. La cantidad del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y se varía de acuerdo con el tratamiento particular involucrado y/o los agentes terapéuticos adicionales utilizados para el tratamiento. Un experto en la técnica apreciará que a veces es necesario hacer variaciones de rutina a la dosificación dependiendo de la edad y condición del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una variedad de vías, que incluyen oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inhalatoria, bucal, sublingual, intrapleural, intratecal, intranasal y similares. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta solicitud incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. En un ejemplo, el primer compuesto y/o el al menos un agente terapéutico adicional se mezclan en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, amortiguador o propelador que se requiera.

65 Tal como se usa en la presente, "PO" o "per os" se refiere a la administración oral; "SQ" se refiere a la administración subcutánea; y "QD" se refiere a la administración una vez al día.

El término "dosis instantánea" se refiere a formulaciones que son formas de dosificación de dispersión rápida.

El término "liberación inmediata" se define como una liberación de un agente terapéutico (tal como un primer compuesto o al menos un agente terapéutico adicional) a partir de una forma de dosificación en un período de tiempo relativamente breve, generalmente de hasta aproximadamente 60 minutos. El término "liberación modificada" se define para incluir liberación retardada, liberación prolongada y liberación pulsada. El término "liberación pulsada" se define como una serie de liberaciones de fármaco a partir de una forma de dosificación. El término "liberación sostenida" o "liberación prolongada" se define como la liberación continua de un agente terapéutico a partir de una forma de dosificación durante un período prolongado.

Un "sujeto" incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, aves y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, aves y similares). En un ejemplo, el sujeto es humano. En un aspecto, el sujeto es una mujer. En un aspecto, el sujeto es hombre.

Tal como se usa en la presente, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, portadores y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

"Vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo o excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo indeseable, e incluye un excipiente que es aceptable para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluye tanto uno como más de uno de dichos excipientes.

La composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

El primer compuesto puede administrarse en un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, las dosis por día normalmente caen dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En el tratamiento de humanos adultos, se usa el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg/día, en dosis única o dividida. En un ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1500 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 26 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg de un primer compuesto. En otro ejemplo, la formulación comprende aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg o aproximadamente 50 mg de un primer compuesto. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del primer compuesto administrado realmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluida la padecimiento a tratar, la vía de administración elegida, la forma del primer compuesto administrado, los agentes terapéuticos adicionales administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no pretenden limitar el alcance de la aplicación de ninguna manera. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario dañino, siempre que dichas dosis mayores se dividan primero en varias dosis más pequeñas para su administración a lo largo del día.

"Fibrosis" se refiere a un padecimiento que implica el desarrollo de tejido conectivo fibroso excesivo, por ejemplo, tejido cicatricial, en un tejido u órgano. Dicha generación de tejido cicatricial puede ocurrir en respuesta a una infección, inflamación o lesión del órgano debido a una enfermedad, traumatismo, toxicidad química, etc. La fibrosis puede desarrollarse en una variedad de diferentes tejidos y órganos, incluyendo el hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, etc.

Tal como se usa en la presente, una "padecimiento colestásico" se refiere a cualquier enfermedad o padecimiento en la que la excreción biliar del hígado está alterada o bloqueada, que puede ocurrir en el hígado o en los conductos biliares. La colestasis intrahepática y la colestasis extrahepática son los dos tipos de padecimientos colestásicos. La colestasis intrahepática (que ocurre dentro del hígado) se observa con mayor frecuencia en la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la sepsis (infección generalizada), la hepatitis alcohólica aguda, la toxicidad farmacológica, la nutrición parenteral total (que se alimenta por vía intravenosa), la neoplasia maligna, la fibrosis quística y el embarazo. La colestasis extrahepática (que ocurre fuera del hígado) puede ser causada por tumores del conducto biliar, estenosis, quistes, divertículos, formación de cálculos en el conducto biliar común, pancreatitis, tumor pancreático o pseudoquiste, y compresión debido a una masa o tumor en un órgano cercano.

Los síntomas y signos clínicos de un padecimiento colestásico incluyen: comezón (prurito), fatiga, ictericia en la piel o los

ojos, incapacidad para digerir ciertos alimentos, náuseas, vómitos, heces pálidas, orina oscura y dolor abdominal en el cuadrante superior derecho. Un paciente con un padecimiento colestásico puede ser diagnosticado y seguido clínicamente en función de un conjunto de pruebas de laboratorio clínico estándar, incluida la medición de los niveles de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT), 5' nucleotidasa, bilirrubina, ácidos biliares y colesterol en el suero sanguíneo de un paciente. En general, se diagnostica que un paciente tiene un padecimiento colestásico si los niveles séricos de los tres marcadores de diagnóstico, fosfatasa alcalina, GGT y 5' nucleotidasa, se consideran anormalmente elevados. El nivel sérico normal de estos marcadores puede variar hasta cierto punto de un laboratorio a otro y de un procedimiento a otro, dependiendo del protocolo de prueba. Por lo tanto, un médico podrá determinar, en función del laboratorio específico y el procedimiento de prueba, cuál es un nivel sanguíneo anormalmente elevado para cada uno de los marcadores. Por ejemplo, un paciente que no tiene un padecimiento colestásico generalmente tiene más de aproximadamente 125 UI/L de fosfatasa alcalina, más de aproximadamente 65 UI/L de GGT y más de aproximadamente 17 NIL 5" nucleotidasa en la sangre. Debido a la variabilidad en el nivel de marcadores séricos, se puede diagnosticar un padecimiento colestásico sobre la base de niveles anormales de estos tres marcadores además de al menos uno de los síntomas mencionados anteriormente, como comezón (prurito).

15 El término "cirrosis biliar primaria" se usa indistintamente con el término "colangitis biliar primaria", y a menudo se abrevia PBC. La PBC es una enfermedad autoinmune del hígado marcada por la lenta destrucción progresiva de los pequeños conductos biliares del hígado, con los conductos intralobulares (canales de Hering) afectados temprano en la enfermedad. Cuando estos conductos están dañados, la bilis se acumula en el hígado (colestasis) y con el tiempo daña el tejido. Esto 20 puede provocar cicatrices, fibrosis y cirrosis. La cirrosis biliar primaria se caracteriza por la destrucción del conducto biliar interlobular. Los hallazgos histopatológicos de la cirrosis biliar primaria incluyen: inflamación de los conductos biliares, caracterizada por linfocitos intraepiteliales y granulomas epiteloides periductales. Hay 4 etapas de PBC.

25 Etapa 1 - Etapa portal: Tríadas de tamaño normal; inflamación portal, daño sutil del conducto biliar. Los granulomas a menudo se detectan en esta etapa.

Etapa 2 - Etapa periportal: Tríadas agrandadas; fibrosis y/o inflamación periportal. Por lo general, esta etapa se caracteriza por el hallazgo de una proliferación de pequeños conductos biliares.

30 Etapa 3 - Etapa septal: Septos fibrosos activos y/o pasivos.

Etapa 4 - Cirrosis biliar: Nódulos presentes; guirnaldas

35 El término "colangitis esclerosante primaria" (PSC) es una enfermedad de los conductos biliares que causa inflamación y posterior obstrucción de los conductos biliares tanto a nivel intrahepático (dentro del hígado) como extrahepático (fuera del hígado). La inflamación impide el flujo de bilis al intestino, lo que en última instancia puede provocar cirrosis hepática, insuficiencia hepática y cáncer de hígado.

40 El término "esteatohepatitis no alcohólica" (NASH) es la inflamación del hígado causada por una acumulación de grasa en el hígado. En algunas personas, la acumulación de grasa causa inflamación del hígado. Debido a la inflamación, el hígado no funciona tan bien como debería. La NASH puede empeorar y causar cicatrices en el hígado, lo que conduce a la cirrosis. La NASH es similar al tipo de enfermedad hepática que es causada por el consumo excesivo de alcohol a largo plazo. Pero la NASH ocurre en personas que no abusan del alcohol.

45 El término "órgano" se refiere a una estructura diferenciada (como en un corazón, pulmón, riñón, hígado, etc.) que consiste en células y tejidos y que realiza alguna función específica en un organismo. Este término también abarca las partes del cuerpo que realizan una función o cooperan en una actividad (por ejemplo, un ojo y las estructuras relacionadas que conforman los órganos visuales). El término "órgano" abarca además cualquier estructura parcial de células y tejidos diferenciados que es potencialmente capaz de desarrollarse en una estructura completa (por ejemplo, un lóbulo o una sección de un hígado).

50 En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva. Todos los porcentajes y proporciones utilizados en la presente, a menos que se indique lo contrario, son en peso.

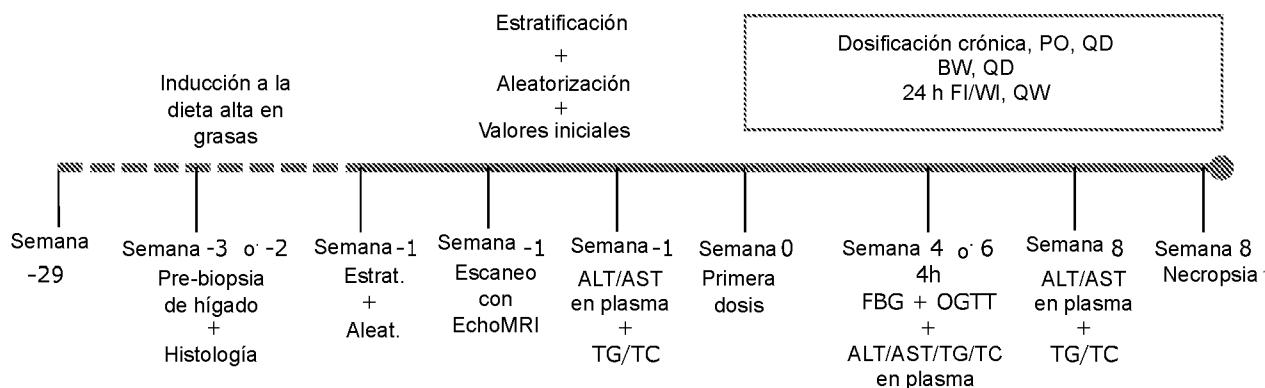
### Ejemplos

60 **Ejemplo 1:** NASH por obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL/6j

Los estudios se realizaron para evaluar los efectos del ácido obeticólico (OCA) y un agente terapéutico que disminuye el nivel de glucosa en sangre, estimula la secreción de insulina y/o aumenta la sensibilidad a la insulina, solo o en combinación, en los parámetros metabólicos, la patología hepática y la puntuación de actividad NAS en ratones NASH obesos inducidos por la dieta. Los agentes terapéuticos utilizados en los Ejemplos 2, 3 y 4 fueron liraglutida (LIRA), metformina (MET) o sitagliptina (SIT), respectivamente. En un estudio, el agente antiglucémico es empagliflozina (EMP).

Además, se realizó el perfil de expresión génica hepática y el análisis de la vía posterior para determinar si la combinación regula los genes novedosos no regulados por el tratamiento de monoterapia y/o regula más fuertemente los genes también afectados por la monoterapia.

## 5 Esquema del estudio



### Animales, alojamiento y dieta

Se adquirieron ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad de JanVier, Francia, y se transfirieron a los compartimentos de prueba. Durante el período de aclimatación e inducción a dieta alta en grasas, los ratones se alojaron en grupo cinco por jaula en gabinetes hechos a la medida en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas de 3 AM-3PM) en condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $50 \pm 10\%$  de humedad relativa). A lo largo del período de inducción y estudio de la dieta, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta alta en grasas (n=110, DIO-NASH) (D09100301, Research Diet, EE. UU.) (40 % de grasas (18 % de grasas trans), 40 % de carbohidratos (20 % de fructosa) y 2 % de colesterol) o comida regular para roedores (n=10, LEAN-CHOW) (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca) y agua del grifo. Los animales se mantuvieron en la dieta durante 28 semanas antes de la experimentación y se mantuvieron en la dieta durante todo el período de estudio. Durante la recuperación postoperatoria y durante todo el período de estudio, todos los animales se alojaron en un solo alojamiento.

### Asignación a estudios, aleatorización estratificada y seguimiento basal

Después de 27 semanas de inducción dietética, se obtuvo una biopsia hepática para la progresión hepática de la esteatosis mediante evaluación histológica. En la semana 2 (combinación SIT) o -1 (combinación de LIRA y MET) antes de la dosificación, se realizó una aleatorización estratificada en grupos de tratamiento de acuerdo con la puntuación de esteatosis y el peso corporal. Los animales se escanearon usando EchoMRI (EchoMRI, EE. UU.) para determinar el análisis de la composición corporal. El escaneo con EchoMRI mide la grasa y la masa de tejido libre de grasa. Se recogieron muestras de sangre de la mejilla (submandibular) en un estado consciente y sin ayuno para el análisis plasmático inicial de los niveles de ALT, AST, TG y TC.

### Procedimiento previo a la biopsia

El día del procedimiento quirúrgico, los ratones se anestesiaron con isoflurano (2-3 %) en oxígeno al 100 %. Se realizó una pequeña incisión abdominal en la línea media y se expuso el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se extirpó una cuña en forma de cono de tejido hepático (~100 mg) de la porción distal del lóbulo, se pesó y se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4 % para histología. La superficie cortada del hígado se electrocoaguló instantáneamente utilizando coagulación bipolar (unidad electroquirúrgica ERBE VIO 100). Se devolvió el hígado a la cavidad abdominal y se suturó la pared abdominal y se cerró la piel con grapas. Para la recuperación postoperatoria, los ratones recibieron carprofeno (5 mg/ml - 0,01 ml/10 g) y enrofloxazina (5 mg/ml - 1 ml/kg) administrados por vía subcutánea el día del procedimiento de operación y los días 1 y 2 después de la operación.

Preparación de la biopsia hepática para la evaluación histológica: Despues del almacenamiento durante la noche en PFA al 4 %, las biopsias hepáticas se infiltraron durante la noche en parafina en un procesador de tejidos automatizado Miles Scientific Tissue-TEK VIP y posteriormente se incorporaron en bloques de parafina. Las biopsias de cinco animales diferentes se incorporaron en un bloque. Despues se recortaron los bloques y se cortaron dos secciones de 3  $\mu\text{m}$  (para tinción H&E) en un microtomo Microm HM340E (Thermo Scientific). Se colocaron dos bloques en un portaobjetos, dando un total de 10 biopsias por portaobjetos que representan 10 animales diferentes. Las secciones se dejaron secar durante la noche. La evaluación del grado de esteatosis para la estratificación y la aleatorización en grupos de tratamiento se realizó como se describe en Kleiner *et al.* (2005) por un histólogo que fungió como ciego a las condiciones de tratamiento.

### Análisis de sangre y plasma

5 Se recogieron muestras de sangre en tubos capilares de vidrio heparinizado de 10 µL. La muestra se suspendió inmediatamente en amortiguador (0,5 ml de solución del sistema de glucosa/lactato (EKF-diagnostics, Alemania) y se analizó para determinar la glucosa el día de la prueba utilizando un medidor de glucosa BIOSEN c-Line (EKF-diagnostics, Alemania). Para el contenido de triglicéridos y colesterol, se recogieron 100 µl de sangre en tubos de litio-heparina. Se separó el plasma y las muestras se almacenaron a 4 °C durante un día antes del análisis.

#### Prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

10 En la semana 4 (combinaciones de LIRA y MET) o la semana 6 (combinación SIT) de tratamiento, se realizó una OGTT en animales despiertos en libre movimiento. La última dosis del fármaco se administró aproximadamente 18 horas antes de la OGTT y los animales no recibieron la dosificación del fármaco antes de la prueba. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 h antes del inicio de la prueba (el alimento se quitó de 6 a. m. a 10 a. m.). A t=0, los ratones recibieron un bolo oral de glucosa (2 g/kg) (200 mg/ml; Fresenius Kabi, Suecia) por sonda oral (10 ml/kg). Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola (a través de un corte) y se midió la glucosa en sangre en el punto de tiempo 0, 15, 30, 60 15 y 120 minutos después de la administración oral de glucosa. Se volvió a alimentar a los ratones después de la toma de muestras de sangre y se les administró el fármaco como de costumbre.

#### Sacrificio y necropsia

20 Los animales se sacrificaron en la semana 8 (día de tratamiento 56) en un estado sin ayuno. La última dosis del fármaco se administró aproximadamente 18 horas antes del sacrificio y los animales no recibieron la dosificación del fármaco antes de la prueba. Los animales fueron inducidos por CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> y durante la anestesia (isoflurano), se abrió la cavidad abdominal y se obtuvo sangre cardíaca para la recolección de plasma terminal. Tras la necropsia, se recogió todo el hígado y se pesó. El lóbulo lateral izquierdo se dividió en trozos y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para el análisis 25 de la expresión génica y en PFA al 4 % para el análisis histológico y bioquímico. Un trozo de hígado se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para su análisis bioquímico.

#### Procesamiento del tejido hepático

30 Tejido hepático terminal: Despues de 8 semanas de tratamiento, se recogió todo el hígado, se pesó y se extirparon biopsias hepáticas del lóbulo lateral izquierdo y se colocaron inmediatamente en PFA al 4 % (~150-200 mg) y se congelaron instantáneamente (~50 mg). Se recogió un trozo de hígado (~100 mg) en un tubo FastPrep y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido.

35 Fijación, incorporación y cortes para histología: Despues de una fijación nocturna en PFA al 4 %, las biopsias hepáticas se infiltraron durante la noche en parafina en un procesador de tejidos automatizado Miles Scientific Tissue-TEK VIP y posteriormente se incorporaron en bloques de parafina. Las biopsias de cinco animales diferentes se incorporaron en un bloque. Los bloques se recortaron y se cortaron dos secciones de 3 µm por bloque en un Microtomo Microm HM340E (Thermo Scientific).

40 40 Homogeneización de tejidos para análisis de triglicéridos y colesterol hepáticos: Se agregó 1 mL de solución de NH-40 al 5 %/ddH<sub>2</sub>O (ab 142227, Abbeam) al tubo FastPrep. Los tubos se colocaron en un homogeneizador FastPrep y se agitaron durante 2 x 60 segundos. Despues de la homogeneización, las muestras se calentaron lentamente a 80-100 °C en un bloque de calentamiento durante 3 minutos. Despues de enfriarse a temperatura ambiente, se repitió la etapa de calentamiento. Las muestras se centrifugaron durante dos minutos a velocidad máxima usando una microcentrifuga para eliminar cualquier material insoluble. El sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su uso. El contenido de triglicéridos y colesterol en los homogeneizados de hígado se midió en determinaciones únicas utilizando el autoanalizador Cobas C-111 con un kit comercial (Roche Diagnostics, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 50 Purificación de ARN para sec. de ARN: La lisis del tejido se realizó utilizando un sistema MP FastPrep. En resumen, se homogeneiza una biopsia hepática de 30-50 mg y se utiliza para la extracción de ARN en columnas de ARN NucleoSpin Plus (Macherey-Nagel) según lo recomendado por el proveedor. La cantidad de ARN se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

55 55 Evaluación de la esteatosis hepática

Para evaluar la esteatosis hepática, las secciones hepáticas se tiñeron con H&E seguido de análisis con el software Visiomorph (Visiopharm, Copenhague, Dinamarca). La evaluación cuantitativa hepática terminal de la esteatosis se describió como el porcentaje del área total utilizando un protocolo diseñado para el propósito específico. Tinción HE: A las 60 secciones incorporadas en parafina se les quitó la parafina en xileno y se rehidrataron en series de etanol graduado. A continuación, las secciones se incubaron durante 5 min en hematoxilina de Mayer (n.º de cat. S3309, Dako), se lavó durante 5 minutos en agua corriente del grifo y luego se tiñó durante 15 segundos en solución de Eosina Y (Cat. No. HT110280 2.5L, Sigma-Aldrich). Los portaobjetos se hidrataron, se montaron con Pertex y se dejaron secar antes de escanear.

65 65 Puntuación total de actividad de NAFLD (NAS)

El puntaje de actividad de NAFLD (NAS) proporciona un valor numérico para los pacientes que probablemente tengan NASH y es la suma de los puntajes separados para esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonamiento hepatocelular (0-3). La mayoría de los pacientes con NASH presentan una puntuación NAS de  $\geq 5$ . En estos experimentos, el tejido hepático terminal del lóbulo lateral izquierdo se recolectó para NAS mediante el uso de criterios clínicos descritos por 5 Kleiner y colegas (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, Kleiner *et al*, Hepatology 41; 2005). Los criterios utilizados para determinar el NAS se proporcionan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1.

Característica	Grado	Puntaje
Esteatosis	<5 %	0
	5-33 %	1
	>33-66 %	2
	>66 %	3
Inflamación lobular	Sin focos	0
	<2 focos/200x	1
	2-4 focos/200x	2
	>4 focos/200x	3
Degeneración en forma de balón	Ninguno	0
	Pocos	1
	Muchas celdas/inflado prominente	2

#### 10 Secuencia de ARN: Expresión génica hepática terminal y análisis bioinformáticos

Los datos de secuenciación se alinearon con el genoma de *Mus musculus* obtenido de la base de datos Ensembl utilizando el software Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR). El script de python HTSeq-count disponible en el paquete HTSeq se utilizó para contar el número de lecturas que se asignan a las regiones anotadas. Todos los pasos de análisis 15 posteriores se implementaron como scripts para R. Para el análisis bioinformático, la calidad de los datos se evaluó utilizando los parámetros de control de calidad estándar de secuencia de ARN. Para evaluar la variabilidad inter e intragrupo, se realizaron análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico. Para identificar los genes expresados diferencialmente se utilizó edgeR del paquete R. La lista de genes expresados diferencialmente se cruzó con información sobre biomarcadores de NASH establecidos. Se realizaron análisis de vías para identificar vías 20 diferencialmente perturbadas entre los grupos.

#### Ejemplo 2. NASH por obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL/6j Ácido obeticólico (OCA) $\pm$ Liraglutida (LIRA)

Los protocolos y análisis para este estudio se proporcionan en el Ejemplo 1.

#### 25 Grupos de tratamiento

Grupo 1: Vehículo (PO) + Vehículo (SQ) ratones (n=12) se les administró vehículo de la semana 0 a la 8.

30 Grupo 2: OCA (PO) + Vehículo (SQ) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 3: LIRA (SQ) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró LIRA a una dosis de 0,1 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 4: OCA (PO) + Vehículo (SQ) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8.

35 Grupo 5: LIRA (SQ) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró LIRA a una dosis de 0,4 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 6: OCA (PO) + LIRA (SQ) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg y LIRA a una dosis de 0,1 mg/kg de la semana 0 a la 8.

40 Grupo 7: OCA (PO) + LIRA (PO) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg y LIRA a una dosis de 0,4 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 8: Los ratones del grupo de control de Alimento Magro (Lean Chow) (n=9) fueron alimentados con alimento magro de la semana 0 a la 8.

#### 45 Compuestos y dosificación

Todos los ratones recibieron dosificación PO (OCA) o SQ (LIRA) una vez al día. El día 0 fue el primer día de dosificación, mientras que el día 55 fue el último día. Por lo tanto, se dosificó a los ratones una vez al día desde el día 0 hasta el día

55 inclusive. Los ratones recibieron 112 dosis en total del agente terapéutico o del vehículo solo. Los animales se trataron entre las 2:00 y las 4:00 p. m. El OCA se disolvió en concentraciones de stock finales de 1 mg/ml y 3 mg/ml para concentraciones de dosis final de 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El vehículo utilizado para OCA fue carboximetilcelulosa sódica (CMC) al 0,5 %.

5

## Resultados y discusión

### *Puntuaciones NAS*

10 El diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se establece por la presencia de un patrón característico de esteatosis, inflamación y balonamiento hepatocelular en las biopsias hepáticas. El puntaje de actividad de NAFLD (NAS) proporciona un valor numérico para los pacientes que probablemente tengan NASH, y la mayoría de los pacientes con NASH tienen un valor de  $NAS \geq 5$ . Los efectos de OCA (10 y 30 mg/kg, PO) y LIRA (0,1 y 0,4 mg/kg, SQ) se evaluaron, solos y en combinación, en los valores de NAS de componentes totales e individuales en los ratones DIO-NASH. Como 15 se usa en el ejemplo 1A, una combinación de dosis baja se refiere a OCA (10 mg/kg) / LIRA (0,1 mg/kg) mientras que la dosis alta se refiere a OCA (30 mg/kg) / LIRA (0,4 mg/kg).

20 Las Figuras 1A y 1B representan la reducción de las puntuaciones NAS de combinaciones de dosis baja y alta de OCA y LIRA después de ocho semanas de tratamiento, respectivamente. Los datos indican que tanto las combinaciones de dosis bajas como las altas reducen el NAS total en relación con el control. En particular, el efecto de la combinación de dosis bajas de OCA y LIRA fue estadísticamente significativo contra los grupos de vehículo, así como la dosis baja de OCA solo. La mayor mejora en NAS fue de aproximadamente tres puntos. La mejora por la combinación de dosis alta redujo el valor 25 de NAS de 4,6 a 1,6 ( $p<0,05$  frente a OCA en monoterapia). Aproximadamente dos de los puntos se debieron a la reducción del componente de esteatosis. El efecto de dosis bajas y altas de la combinación de OCA y LIRA sobre el componente de esteatosis se muestra en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Ambas combinaciones de dosis mejoraron la esteatosis de manera estadísticamente significativa ( $p<0,05$  frente a OCA o LIRA en monoterapia).

### *Triglicéridos y colesterol hepáticos*

30 Como el hígado graso se caracteriza por una acumulación de lípidos que incluyen triglicéridos y colesterol, se examinó el efecto de las combinaciones de dosis baja y alta de OCA y LIRA. Después de ocho semanas de tratamiento, la combinación redujo los triglicéridos hepáticos de manera significativamente estadística como se muestra en las Figuras 3A y 3B. Ambas combinaciones de dosis redujeron los niveles de triglicéridos y colesterol en el hígado, mientras que la combinación de dosis bajas dio un efecto sinérgico. Con respecto al colesterol, la combinación de dosis alta redujo el nivel 35 de colesterol en el hígado de una manera estadísticamente significativa como se muestra en las Figuras 4A y 4B.

### *Peso corporal y composición*

40 LIRA está indicada en los EE. UU. como un complemento del estilo de vida para el control crónico del peso en personas obesas. Sin embargo, la FDA requirió una REMS (Estrategia de Evaluación y Mitigación de Riesgos) debido a que los riesgos potenciales asociados con la LIRA incluyen el carcinoma medular de tiroides y el riesgo de pancreatitis aguda, incluida la pancreatitis necrotizante. Por lo tanto, es muy deseable usar una dosis más baja de LIRA mientras se mantiene su efecto máximo de pérdida de peso. El efecto de la combinación de dosis bajas sobre el peso corporal se proporciona en la figura 5. Como se muestra en la Figura 5, la combinación de dosis baja de OCA y LIRA disminuyó sinérgicamente el peso corporal en aproximadamente un 13 % en relación con la monoterapia sola. Con respecto a la composición corporal, las Figuras 6A y 6B revelan que las combinaciones de dosis baja y alta redujeron la adiposidad (o masa de tejido graso) en relación con el peso corporal. En particular, la combinación de dosis alta de OCA y LIRA sinérgica redujo la adiposidad en ratones.

45 50

### *Ánalisis transcriptómico*

55 La secuenciación del ARN se realizó en muestras de ARNm hepático de los ratones del estudio para obtener información sobre los mecanismos y vías subyacentes en la mejora del NAS total mediante las terapias de combinación. Se examinaron los siguientes genes: efector C similar a DFFA que induce la muerte celular; proteína 2 de unión al ADN que contiene el dominio efector de la muerte; 2-hidroxiacil-CoAlasa 1, unión a lectina galactosa; proteína 3 similar a la proteína de unión a oxisterol; receptor de estrógeno; gen inducido por insulina, lipina1; y proteína bisagra ubiquinol-citocromo C reductasa. Se compararon los genes regulados diferencialmente entre las combinaciones de dosis baja y alta, el control y cada monoterapia respectiva. El efecto de mantener a los ratones en una dieta alta en grasas del estudio ilustra estos procesos en los que los genes significativamente regulados al alza y a la baja se cambiaron en función del tratamiento de monoterapia o terapia de combinación. Los valores cuantitativos de los niveles de expresión afectados por la combinación de dosis baja con respecto a la monoterapia se proporcionan en las Figuras 7A-7E. La Tabla 2 describe la función predicha y la regulación cualitativa de los genes involucrados en el desarrollo de la fibrosis. La combinación reguló la expresión génica de una manera estadísticamente significativa en relación con el grupo al que se aplicó vehículo.

60

65

Tabla 2.

Gen	Nombre (s) completo (s)	Función prevista	Combinación frente a dosis bajas de LIRA en monoterapia	Combinación frente a dosis bajas de OCA en monoterapia
CIDEc	Efecto C similar a DFFA que induce la muerte celular	Regulado positivamente en NASH, promueve gotas de lípidos en los adipocitos	↓	↓
Dedd2	Proteína de unión al ADN que contiene el dominio efecto de la muerte 2	Receptor de actividad quimiotáctica para linfocitos	↓	↓
Hacl1	2-Hidroxiacil-CoA liasa 1	Biología peroxisomal, descompone los ácidos 2-hidroxigrasos de cadena larga	↑	↑
Lgls1	Unión a galactosa de lectina	Modula la adhesión célula-célula, célula-matriz	↓	↓
osbp13	Proteína de unión a oxisterol similar a 3	Regula la adhesión y organización celular	↓	↓

La comparación de los niveles de expresión afectados por la combinación de dosis alta se proporciona en las Figuras 8A-8D. La Tabla 3 describe el papel o función predicha de cada gen en el desarrollo de NASH.

5

Tabla 3.

Gen	Nombre (s) completo (s)	Rol o función prevista	Combinación frente a monoterapia con liraglutida	Combinación frente a Monoterapia con OCA
ER	Receptor de estrógeno	El estrógeno protege contra la fibrosis	↑	↑
INSIG1	Gen inducido por insulina	La disminución conduce a un aumento de la síntesis de CHOL. La regulación a la baja es consistente con las disminuciones en CHOL hepático y, en última instancia, la progresión de NASH	↑	↑
LPIN1	Lipin1	Coordina el metabolismo hepático mitocondrial y de glicerolípidos	↓	↓
UQCRH	Proteína bisagra de ubiquinol-citocromo C reductasa	Interacciones con SIRT1 y SIRT3: aumentos en SIRT consistentes con un mejor estado metabólico.	↑	↑

**Ejemplo de Referencia 3.** NASH por obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL/6j Ácido Obeticólico (OCA) ± Metformina (MET)

10 Los protocolos y análisis para este estudio se proporcionan en el Ejemplo 1.

#### Grupos de tratamiento

Grupo 1: Vehículo (PO) ratones (n=11) se les administró vehículo (CMC al 0,5 %) de la semana 0 a la 8.

15 Grupo 2: OCA (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=11) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 3: MET (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró MET a una dosis de 50 mg/kg de la semana 0 a la 8.

20 Grupo 4: OCA (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=11) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 5: MET (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró MET a una dosis de 150 mg/kg de la semana 0 a la 8.

Grupo 6: OCA (PO) + MET (PO) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg y MET a una dosis de 50 mg/kg de la semana 0 a la 8.

5 Grupo 7: OCA (PO) + MET (PO) ratones (n=10) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg y MET a una dosis de 150 mg/kg de la semana 0 a la 8.

10 Grupo 8: Los ratones del grupo de control de Alimento Magro (Lean Chow) (n=10) fueron alimentados con alimento magro de la semana 0 a la 8.

### 15 5 Comuestos y dosificación

10 Todos los ratones recibieron dosificación PO una vez al día. El día 0 fue el primer día de dosificación, mientras que el día 55 fue el último día. Por lo tanto, se dosificó a los ratones una vez al día desde el día 0 hasta el día 55 inclusive. Los ratones recibieron 56 dosis en total. Los animales se sometieron a tratamiento entre las 2:00 y las 4:00 p. m. El OCA se disolvió en concentraciones de solución madre finales de 1 mg/ml y 3 mg/ml para concentraciones de dosis final de 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El MET se preparó en concentraciones de solución madre finales de 5 mg/ml y 15 mg/ml para concentraciones de dosis final de 50 mg/kg y 150 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El vehículo utilizado para OCA y MET fue carboximetilcelulosa sódica (CMC) al 0,5 %.

### 15 Resultados

#### 20 Puntuaciones NAS

25 El diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se establece por la presencia de un patrón característico de esteatosis, inflamación y balonamiento hepatocelular en las biopsias hepáticas. El puntaje de actividad de NAFLD (NAS) proporciona un valor numérico para los pacientes que probablemente tengan NASH, y la mayoría de los pacientes con NASH tienen un puntaje NAS de  $\geq 5$ . Los efectos de OCA (10 y 30 mg/kg, PO) y MET (50 y 150 mg/kg, PO) se evaluaron, solos y en combinación, en el NAS de componentes totales e individuales en los ratones DIO-NASH. Como se usó en el ejemplo 1B, una combinación de dosis baja se refiere a OCA (10 mg/kg) / MET (50 mg/kg) mientras que la dosis alta se refiere a OCA (30 mg/kg) / MET (150 mg/kg).

30 La Figura 9A representa el efecto de la alta dosis de combinación de OCA y MET en la NAS total. La combinación de dosis alta de OCA y MET redujo el NAS ( $p<0,05$  frente al control de OCA) de una manera estadísticamente significativa al final del estudio. Con respecto a los componentes individuales, el efecto de la dosis alta de la combinación de OCA y MET sobre el componente de esteatosis se muestra en las Figuras 9B.

#### 35 Niveles de glucosa en sangre

40 La prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) es una prueba médica en la que la glucosa se administra por vía oral y luego se toman muestras de sangre para determinar el tiempo en que la glucosa se elimina de la sangre. El ensayo se realiza para evaluar la diabetes, la resistencia a la insulina y la función alterada de las células beta. En la semana cuatro del estudio, se administró una dosis de glucosa por vía oral y se analizaron los niveles sanguíneos cuatro horas después.

45 Las Figuras 10A y 10B muestran que las combinaciones de dosis baja y alta de OCA y MET disminuyeron la glucosa en sangre en la semana 4 de tratamiento en comparación con el grupo de vehículo DIO-NASH. La Tabla 4 proporciona los niveles de glucosa en sangre (AUC) de las combinaciones de dosis baja y alta según lo medido en la OGTT.

Tabla 4.

Grupos de tratamiento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
AUC de glucosa en sangre OGTT, (mmol/L x min) Semana 4	1762 $\pm$ 45	1680 $\pm$ 71	1698 $\pm$ 31	1778 $\pm$ 88	1480 $\pm$ 53 **	1538 $\pm$ 43 **	1416 $\pm$ 33 ** ++	1615 $\pm$ 61

45 AUC se refiere al área bajo la curva; \*\*  $P<0,01$  frente al Grupo 1; y ++  $P<0,01$  frente al Grupo 6

#### 50 Análisis de expresión génica diferencial

55 La secuenciación del ARN se realizó en muestras de ARNm hepático de los ratones del estudio para obtener información sobre los mecanismos y vías subyacentes en la mejora del NAS total mediante las terapias de combinación. El análisis de expresión génica diferencial se realizó en muestras de hígado terminal recolectadas de animales tratados con OCA y MET, solos y en combinación. Se compararon los genes regulados diferencialmente entre las combinaciones de dosis baja y cada monoterapia respectiva. La Figura 11 y los datos de la tabla 5 divulgán el número de genes regulados por OCA y MET, solos y en combinación. En general, si bien los tratamientos de monoterapia no alteraron los genes en relación con el grupo de vehículo, una cantidad de genes se reguló de forma única en la combinación en relación con el grupo de vehículo consistente con los efectos sinérgicos para mejorar la NASH. Los diagramas de Venn de las figuras 12A-12C proporcionan una comparación fácil del número de genes regulados. Los resultados demuestran que los genes únicos relacionados con la fibrosis estaban regulados en la combinación en relación con los grupos de monoterapia consistentes con los efectos sinérgicos para mejorar la NASH.

Tabla 5.

Grupos de tratamiento	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Número de genes regulados	21	181	689	120	1109	1858

5 Para la combinación de dosis bajas, los siguientes genes de la familia de receptores de colágeno se regularon de forma única: colágeno tipo 14a1, colágeno tipo 6a1 y colágeno tipo 6a2. Véanse las figuras 13A-13C, respectivamente. Otros genes de interés que fueron regulados son el receptor de decorina, el miembro 10 de la subfamilia de colectina, el receptor III del factor de crecimiento transformante beta y el factor de crecimiento transformante inducido por beta. Véanse las figuras 14A-14F.

10 Para la combinación de dosis altas, los genes regulados diferencialmente en la familia de receptores de colágeno son colágeno tipo 14a1, colágeno tipo 6a1 y colágeno tipo 6a2. Véanse las figuras 15A-15C, respectivamente. Se examinaron otros genes de interés como el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas, decorina, miembro de la subfamilia de colectina 10, receptor beta del factor de crecimiento transformante III y factor de crecimiento transformante inducido por beta (figuras 16A-16E).

15 20 Con respecto a los genes del factor de fibrosis, la familia de receptores de colágeno es de particular interés. El colágeno se encuentra en muchos lugares del cuerpo. Sin embargo, más del 90 % del colágeno en el cuerpo humano es del tipo I. Hay 29 colágenos genéticamente distintos presentes en los tejidos animales. Los tipos de colágeno I, II, III, V y XI se autoensamblan en fibrillas cruzadas periódicas D-estriadas. Aquí la D es de aproximadamente 67 nm y hay una periodicidad axial característica del colágeno. Estos forman los colágenos más abundantes en los vertebrados.

25 El receptor de laminina 1 participa en la remodelación de la membrana (es deseable lograr un nivel de laminina más bajo para tratar la fibrosis). La colectina codifica un miembro de la familia de la C-lectina, proteínas que poseen secuencias similares al colágeno y dominios de reconocimiento de carbohidratos. Los otros miembros de esta familia son proteínas secretadas y se unen a antígenos de carbohidratos en microorganismos facilitando su reconocimiento y eliminación. La decorina desempeña un papel en el ensamblaje de las fibrillas de colágeno. La unión de esta proteína a múltiples receptores de la superficie celular media su papel en la supresión tumoral, incluido un efecto estimulante sobre la autofagia y la inflamación y un efecto inhibidor sobre la angiogénesis y la tumorigénesis. La superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y los factores de crecimiento transformantes están involucrados en la progresión inflamatoria/fibrótica.

30 **Ejemplo de referencia 4.** NASH por obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL/6j Ácido Obeticólico (OCA) ± Sitagliptina (SIT)

Los protocolos y análisis para este estudio se proporcionan en el Ejemplo 1.

### 35 *Grupos de tratamiento*

40 Grupo 1: Vehículo (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=11) se les administró vehículo (CMC al 0,5 %) de la semana 0 a la 8. Grupo 2: OCA (PO) + Vehículo (SQ) ratones (n=11) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.

45 Grupo 3: SIT (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró SIT a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8. Grupo 4: OCA (PO) + Vehículo (SQ) ratones (n=11) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8.

50 Grupo 5: SIT (PO) + Vehículo (PO) ratones (n=12) se les administró SIT a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8. Grupo 6: OCA (PO) + SIT (PO) ratones (n=12) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg y SIT a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.

55 Grupo 7: OCA (PO) + SIT (PO) ratones (n=10) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg y SIT a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8. Grupo 8: Los ratones del grupo de control de alimento magro (Lean Chow) (n=10) fueron alimentados con alimento magro de la semana 0 a la 8.

50 **50 Comuestos y dosificación**

55 Todos los ratones recibieron dosificación PO una vez al día. El día 0 fue el primer día de dosificación, mientras que el día 55 fue el último día. Por lo tanto, se dosificó a los ratones una vez al día desde el día 0 hasta el día 55 inclusive. Los ratones recibieron 56 dosis en total. Los animales se sometieron a tratamiento entre las 2:00 y las 4:00 p. m. El OCA se disolvió en concentraciones de solución madre finales de 1 mg/ml y 3 mg/ml para concentraciones de dosis final de 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El SIT se preparó en concentraciones de solución madre finales de 5 mg/ml y 15 mg/ml para concentraciones de dosis final de 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El vehículo utilizado para OCA y SIT fue carboximetilcelulosa sódica (CMC) al 0,5 %.

60 Resultados

**Actividad DPP-IV**

Los efectos de OCA (10 y 30 mg/kg, PO) se examinaron solos y en combinación con SIT (10 y 30 mg/kg, PO) sobre la actividad de DPP-IV en plasma de los ratones DIO-NASH en la semana 2 de tratamiento. Una combinación de dosis baja se refiere a OCA (10 mg/kg) / SIT (10 mg/kg) mientras que la dosis alta se refiere a OCA (30 mg/kg) / SIT (30 mg/kg). La combinación de dosis baja de OCA y SIT redujo la actividad de DPP-IV en un asunto estadísticamente significativo ( $p < 0,01$  frente al vehículo DIO-NASH). Además, la combinación de dosis alta de OCA y SIT redujo la actividad de DPP-IV en un asunto estadísticamente significativo ( $p < 0,01$  frente al vehículo DIO-NASH). Los resultados farmacológicos demuestran que los agentes terapéuticos produjeron los efectos esperados, es decir, la inhibición de DPP-IV.

**Ejemplo de Referencia 5. Ácido Obeticólico (OCA) ± Empagliflozina (EMP)***Grupos de tratamiento*

15 Grupo 1: A los ratones Vehículo (PO) se les administró vehículo (CMC al 0,5 %) de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 2: A los ratones OCA (PO) + Vehículo (PO) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 3: A los ratones EMP (PO) + Vehículo (PO) se les administró EMP a una dosis de 3 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 4: A los ratones OCA (PO) + Vehículo (PO) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 5: A los ratones EMP (PO) + Vehículo (PO) se les administró EMP a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 20 Grupo 6: A los ratones OCA (PO) + EMP (PO) se les administró OCA a una dosis de 10 mg/kg y EMP a una dosis de 3 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 7: A los ratones OCA (PO) + EMP (PO) se les administró OCA a una dosis de 30 mg/kg y EMP a una dosis de 10 mg/kg de la semana 0 a la 8.  
 Grupo 8: Los ratones del grupo de control de Alimento Magro (Lean Chow) ( $n=10$ ) fueron alimentados con alimento magro de la semana 0 a la 8.

*Compuestos y dosificación*

30 Todos los ratones recibieron dosificación PO una vez al día. El día 0 fue el primer día de dosificación, mientras que el día 55 fue el último día. Por lo tanto, se dosificó a los ratones una vez al día desde el día 0 hasta el día 55 inclusive. Los ratones recibieron 56 dosis en total. Los animales se sometieron a tratamiento entre las 2:00 y las 4:00 p. m. El OCA se disolvió en concentraciones de solución madre finales de 1 mg/ml y 3 mg/ml para concentraciones de dosis final de 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El EMP se preparó en concentraciones de solución madre finales de 5 mg/ml y 15 mg/ml para concentraciones de dosis final de 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El volumen de dosificación fue de 10 mL/kg. El vehículo utilizado para OCA y EMP fue carboximetilcelulosa sódica (CMC) al 0,5 %.

40 Honda, et al., "The Selective SOLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice", PLoS, 2016, describen que los inhibidores del cotransportador de glucosa de sodio 2 (como la empagliflozina) se han investigado por su efecto en ratones DIO-NASH.

**Ejemplo 6: Cultivo intercalado de hepatocitos***Reactivos y soluciones*

45 El medio de cultivo celular adecuado incluye MB-752/1 de Waymouth, F12 de Ham, RPMI 1640, medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio E de Williams, L15 de Leibovitz y medio de Chee modificado. La colagenasa de tipo IV, el colágeno de tipo I, Percoll, el medio de cultivo y los suplementos se agregan al medio de cultivo (por ejemplo, suero, antibióticos, aminoácidos, hormonas tales como DEX, insulina y factores de crecimiento), amortiguador de perfusión y otras soluciones estaban disponibles comercialmente o hechas de materiales disponibles comercialmente. Se pueden utilizar otros tipos de colágeno (tipos II-IV), laminina, fibronectina y proteoglicanos de sulfato de heparina en el cultivo de hepatocitos en intercalado. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno tipo I y IV fue superior a la fibronectina y la laminina en el cultivo de las células.

*Aislamiento de hepatocitos*

55 Se puede utilizar un método de perfusión de colagenasa *in situ* de dos pasos para aislar los hepatocitos. En resumen, los hepatocitos se aislaron tras obtenerse de ratas hembra Lewis. Los animales fueron anestesiados. El hígado se perfundió primero a través de la vena porta *in situ* con un tampón de perfusión. El perfundido se equilibró antes de entrar en el hígado. Posteriormente, el hígado se perfundió con colagenasa en el tampón de perfusión. El hígado se disecó y se transfirió a tampón de perfusión helado. La cápsula hepática se separó y la suspensión celular resultante se filtró. El sedimento celular se recogió por centrifugación y se volvió a suspender. Se agregó Percoll a la suspensión y se separaron los hepatocitos utilizando una técnica de centrifugación por densidad Percoll. La mezcla se centrifugó y el sedimento celular se lavó con medio en dos ocasiones. La viabilidad de los hepatocitos se determinó mediante exclusión con azul de tripano. Alternativamente, se utilizaron hepatocitos crioconservados en lugar de hepatocitos recién aislados.

*Cultivo intercalado de hepatocitos*

Los hepatocitos aislados se cultivaron en placas de cultivo tisular recubiertas de colágeno y se mantienen en medio de cultivo suplementado con suero, penicilina, estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico, insulina, glucagón e hidrocortisona. Se prepara una solución gelificante de colágeno mezclando solución de colágeno tipo I y medio de cultivo. Las placas de cultivo tisular se recubren con la solución gelificante y se incuban a 37 °C para promover la formación de gel. Los hepatocitos se siembran a una densidad adecuada y se mantienen a 37 °C. El medio de cultivo se reemplaza cada 24 horas.

Para el sistema intercalado, se distribuye una solución adicional de gel de colágeno sobre las células después de 1 día de cultivo. El medio de cultivo se retira cuidadosamente para garantizar que la segunda capa de gel de colágeno se extienda uniformemente por toda la placa. Las placas de cultivo se incuban a 37 °C para permitir la gelificación y la unión de la segunda capa de gel antes de reemplazar el medio. El medio de cultivo se cambia diariamente. Las muestras del medio se almacenan a -20 °C para su posterior análisis.

Los hepatocitos cultivados entre capas de colágeno gelificado mantienen una forma de cubo tridimensional y una distribución de proteínas citoesqueléticas similar a la observada *in vivo*.

*Optimización de la formación de la red canalicular biliar*

Para optimizar la acumulación de taurocolatos y la excreción biliar, se puede utilizar un medio de cultivo particular, como el medio E de Williams y el medio de Eagle modificado de Dulbecco, en el cultivo de hepatocitos en intercalado.

*Artículos de prueba*

El agonista de FXR destinado al estudio es el ácido obeticólico, también conocido como "OCA" y el ácido 6-etil quenodesoxicólico (6-ECDCA).

**Ejemplo 7:** Evaluar los efectos de los artículos de prueba sobre la liberación de glucosa de las células hepáticas

*Aislamiento de hepatocitos*

Los hígados se obtienen de cerdos hembra de 6 meses de edad después de 12 h de ayuno. Los tejidos se cosechan de los animales. Los hepatocitos se aíslan mediante una modificación del método de perfusión de colagenasa *in situ* de dos etapas basado en el procedimiento descrito por Seglen (Seglen, Methods in Cell Biol. 13, 29 (1976)). Dentro de los 15 minutos posteriores al sacrificio del animal, se extrae el lóbulo derecho del hígado y luego se perfunde con medio de perfusión hepática a 37 °C durante 15-20 minutos, seguido de medio de digestión hepática durante 20-30 minutos. Los hepatocitos se aíslan mediante alteración suave del hígado digerido en medio de suspensión [NaHCO<sub>3</sub> 26,5 mM, Na-HEPES 8,99 mM, fracción V de BSA al 0,2 % (p/v), D-fructosa 2,22 mM, en DMEM con glucosa 5,5 mM y piruvato de Na 1 mM] y se filtran a través de una malla de 200 µm. La suspensión celular resultante se centrifuga a 500 rpm, el sobrenadante se desecha y el sedimento celular se vuelve a suspender en medio de suspensión precalentado (37 °C). La viabilidad celular se evalúa utilizando el método de exclusión azul tripán (Life Technologies, Grand Island, NY) y es consistentemente superior al 85 %. Los recuentos de células se realizan por triplicado y se obtiene el valor medio.

*Cultivos en suspensión*

Inmediatamente después del aislamiento, los hepatocitos se lavan tres veces con DMEM sin suero sin glucosa ni piruvato y luego se vuelve a suspender en 600 µl del mismo medio a una densidad celular de  $30 \times 10^6$ /ml en tubos cónicos de 50 ml. Los tubos se incuban a 37 °C durante 10, 20 y 40 min con agitación continua, solos o con concentraciones crecientes de un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en el presente documento). En cada experimento, la producción de glucosa después de la estimulación con glucagón 100 nM se utiliza como control positivo.

Después del período de incubación, la glucosa liberada en el medio se determina con el método de glucosa-oxidasa utilizando un kit de ensayo Trinder (Sigma), y los resultados de todas las réplicas se normalizan para el contenido de proteínas, que se determinan utilizando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad.

**Ejemplo 8:** Evaluar los efectos de los artículos de prueba sobre el metabolismo de la glucosa de las células hepáticas

*Cultivo celular:*

Los hepatocitos de ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g) se aíslan mediante perfusión de colagenasa del hígado, como se describió anteriormente (Brown *et al.*, Biochem. J. 262, 425 (1989)). La viabilidad, evaluada por exclusión de azul de tripano, supera rutinariamente el 90 %. Se cargaron placas recubiertas de colágeno de seis pocillos con  $10^6$  células vivas por pocillo con 2 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco que contenía suero de ternera fetal al 10 % (vol/vol). Despues de 1 hora, tiempo durante el cual solo las células vivas se unieron a la placa, el medio se aspiró (junto con las

células muertas no unidas) y se reemplazó con medio fresco. Las células se mantienen hasta 48 horas (con al menos un cambio de medio a las 24 horas). Los procedimientos con animales están de acuerdo con los criterios de cuidado humano de la Academia Nacional de Ciencias.

5 *Metabolismo de la glucosa*

Los parámetros del metabolismo de la glucosa de los hepatocitos se miden después de 18 horas de incubación en ausencia o presencia de un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente). La utilización de glucosa se determina como la producción de agua tritiatada (como para los experimentos de oxidación de ácidos grasos) después de la incubación de hepatocitos durante 2 horas en presencia de [5-<sup>3</sup>H]-glucosa (6,5 µCi/mL). La captación de 2-[<sup>3</sup>H]-desoxiglucosa (PERRO; 10 µmol/L, 0,5 µCi/mL) se determina durante 5 minutos después de 30 minutos de preincubación con o sin 100 nmol/L de insulina durante cada período (Perdomo *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279, 27177 (2004)). La incorporación de D-[<sup>14</sup>C]-glucosa (2 µCi/mL) en glucógeno se mide en ausencia o presencia de insulina durante 1 hora (Perdomo *et al.* 2004).

15

**Ejemplo 9:** Evaluar los efectos de los artículos de prueba sobre el metabolismo de la glucosa de las células hepáticas y en ratones

20 *Cultivo celular y transfección transitoria*

Se sembraron células de hepatoblastoma humano (HepG2) en placas de 6 pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se cultivaron en medio de cultivo completo [medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (con L-glutamina suministrado con suero fetal de ternera inactivado al 10 % (vol/vol) y antibióticos-antimicóticos al 1 % (vol/vol))] según fue descrito (Wang *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 22, 1622 (2008)). Al día siguiente, las células se tratan con un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente). Dieciocho horas después del tratamiento, las células se trataron con TPA (50 nM), LPS (1 µg/mL) o TNF-α (10 ng/mL) y después se recolectaron para el aislamiento de ARN después de una incubación de 6 horas.

30 La transfección transitoria de células HepG2 se realizó usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se pretratan con un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente) durante 18 horas, a menos que se indique lo contrario. Las células se trataron posteriormente con o sin LPS o TPA. Después de una incubación de 6 horas, las células se cosechan y la actividad de luciferasa se determina utilizando un sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Las actividades de luciferasa se normalizan mediante la cotransfección del plásmido de luciferasa de *Renilla* impulsado por timidina quinasa de control, phRL-TK. Los datos se expresan como el número de veces de activación relativa con respecto a la de los conjuntos no estimulados.

35 *Cultivo primario de hepatocitos de ratón*

40 Los hepatocitos primarios de ratones de 8 semanas de edad se preparan como se describe (Huang *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 18, 2402 (2004), Huang *et al.*, *J. Clin. Invest.* 113, 137 (2004), Qiao *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 12, 2629 (2001)). Al día siguiente, las células se trataron con un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente). Dieciocho horas después del tratamiento, las células se trataron con LPS (20 µg/mL), TPA (150 nM) o TNF-α (10 ng/mL) y después se recolectó para el aislamiento de ARN después de una incubación de 6 horas.

45 *Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real*

50 El aislamiento de ARN total de células HepG2, hepatocitos primarios de ratón e hígados de ratón y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se realizan como se describe (Yang *et al.*, *Cancer Res.* 67, 863 (2007)). La amplificación de la β-actina se utiliza como referencia interna.

*Animales*

55 Se utilizan ratones de ocho semanas de edad, a menos que se indique lo contrario. Los ratones de tipo silvestre y FXR<sup>-/-</sup> se mantienen en una instalación animal libre de patógenos bajo un estándar 12: Ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se dio a los ratones alimento estándar para roedores y agua *ad libitum*. Los ratones hembra de tipo silvestre y FXR<sup>-/-</sup> de ocho semanas de edad se mantienen en ayunas durante la noche y después se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis única de LPS (20 mg/kg) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente), seguido de ingesta de agua *ad libitum*. Seis horas después de la inyección, los ratones se sacrifican y se extrae sangre e hígados para su posterior análisis. Todos los procedimientos siguieron las pautas de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

65 **Ejemplo 10:** Evaluar los efectos de los artículos de prueba en modelos animales

La resistencia a la insulina es el supuesto mecanismo subyacente clave que vincula la disfunción del tejido adiposo (AT) con la inflamación hepática y la esteatosis en el síndrome metabólico (MetS). Se ha demostrado que OCA mejora la resistencia a la insulina y el perfil metabólico con una marcada reducción en la cantidad de AT visceral (VAT) en un modelo de MetS de conejo inducido por una dieta alta en grasas (HFD). El análisis del VAT y el hígado a través de inmunohistoquímica, transferencia Western y RT-PCR ha demostrado que la dosificación de OCA *in vivo* normaliza el tamaño de los adipocitos, la hipoxia y la expresión de perilipina y el transportador de glucosa regulado por insulina citosólica GLUT4 (SLC2A4), que aumentan significativamente el VAT aislado de los conejos con HFD en comparación con los conejos con una dieta de control. La dosificación de OCA *in vivo* también normaliza la expresión de marcadores de esteatosis e inflamación en conejos con HFD.

#### 10 *Modelo de conejo MetS*

El modelo de conejo inducido por HFD de MetS se obtiene como se describió anteriormente (Filippi *et al.*, J. Sexual Med. 6, 3274 (2009)). Los conejos blancos machos de Nueva Zelanda pesaban aproximadamente 3 kg, se numeraron aleatoriamente y se asignaron a dos grupos diferentes: grupo no tratado, alimentado con una dieta de control (CON) o grupo tratado, alimentado con un HFD (por ejemplo, 0,5 % de colesterol y 4 % de aceite de maní), durante 12 semanas. Un subgrupo de conejos HFD fueron tratados con un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente). La dosis de OCA utilizada se puede seleccionar en función de la eficacia y el análisis farmacocinético llevado a cabo en roedores (Pellicciari *et al.*, J. Med. Chem. 45, 3569 (2002)). Las dosis del agente terapéutico adicional, tales como las descritas en la presente, también se pueden seleccionar en función de la eficacia y el análisis farmacocinético en animales (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cerdos) como se publica en la literatura.

25 Se obtienen muestras de sangre de la vena marginal de la oreja al inicio del estudio y en la semana 12 en todos los grupos. Las mediciones de la presión arterial media y la prueba de tolerancia oral a la glucosa se llevaron a cabo antes de sacrificar a los animales, como se describió anteriormente (Filippi *et al.* 2009). Despues de 12 semanas de tratamiento, los conejos fueron sacrificados utilizando una dosis de pentobarbital (100 mg/kg) y las muestras del hígado, el VAT (acumulado entre las asas intestinales y el mesenterio) y la vesícula biliar se escindieron, pesaron, recolectaron y procesaron cuidadosamente para los análisis posteriores. También se procesaron muestras de VAT de todos los grupos 30 de conejos para el aislamiento de preadipocitos. Los análisis séricos bioquímicos y hormonales se realizaron según se describió anteriormente (Filippi *et al.* 2009, Morelli *et al.*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 132, 80 (2012), Vignozzi *et al.*, J. Endocrinology 212, 71 (2012)).

35 Para evaluar los efectos de MetS, se diseñó un algoritmo que tomó en cuenta la presencia, como variable ficticia, de uno o más de los siguientes factores: hiperglucemia, niveles altos de triglicéridos, niveles altos de colesterol, aumento de la presión arterial y acumulación de grasa visceral. Los puntos de corte para cada factor se derivan de la media  $\pm$  2 S.D [desviaciones estándar] del parámetro analizado, medido en los conejos CON. La positividad para tres o más factores indica MetS.

#### 40 *Tamaño de la muestra*

Suponiendo una probabilidad de ocurrencia de MetS de 2,5 % en el grupo CON y una probabilidad de 60 % en el grupo HFD (Filippi *et al.* 2009, Vignozzi *et al.*, J. Sexual Med. 8, 57 (2011), Vignozzi *et al.* 2012, Maneschi *et al.*, J. Endocrinology 215, 347 (2012), Morelli *et al.* 2012, Morelli *et al.*, Prostate 73, 428 (2013)), el uso de 74 conejos con una relación de asignación de 1:1 entre los grupos permitirá un poder cercano al 100 % para distinguir una diferencia en la tasa de desarrollo de MetS entre los dos grupos de tratamiento. Suponiendo una probabilidad de la aparición de MetS igual al 60 % en el grupo alimentado con el HFD y una probabilidad del 10 % en el grupo alimentado con el HFD y un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente) (Vignozzi *et al.* 2011, Morelli *et al.* 2012), el uso de 54 conejos con una relación de asignación de 2:1 50 permitirá una potencia de aproximadamente el 95 % para distinguir una diferencia en la tasa de desarrollo de MetS entre los dos grupos de tratamiento.

#### *Análisis histomorfométrico del VAT*

55 Las muestras de VAT se analizaron mediante tinción con hematoxilina y eosina para medir el diámetro de los adipocitos, como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012), utilizando el microscopio Nikon Microphot-FXA (Nikon, Tokio, Japón) equipado con el programa de software gratuito ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.), considerando que los adipocitos son regularmente esféricos.

#### 60 *Detección de hipoxia e inmunohistoquímica*

La oxigenación VAT se analizó utilizando el fármaco biorreductor clorhidrato de pimonidazol (hipoxiprobe-1, 60 mg/kg), inyectado i. p. 1 h antes del sacrificio de animales, como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012, Morelli *et al.* 2012, 2013, Vignozzi *et al.* 2012).

65 *Preparación de fracciones totales y de membrana/citosólicas para el análisis de transferencia tipo Western*

Para la extracción de proteínas de las muestras de VAT, los tejidos congelados se molieron en nitrógeno líquido y se dividieron en dos alícuotas: una para la extracción total de proteínas y la otra para las preparaciones de membrana/citosólicas. Las fracciones de membrana y citosólicas se preparan utilizando el kit de extracción de proteoma subcelular ProteoExtract (Calbiochem-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos de proteínas se cuantifican con el reactivo BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA) y 15 mg de cada muestra se resuelven mediante SDS-PAGE al 10 %. El análisis de transferencia Western con un anticuerpo anti-transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EUA) y el anticuerpo anti-perilipina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se realizan como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). La misma carga de proteína se verifica al volver a probar la membrana con un anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). El análisis de densitometría de la intensidad de la banda se realiza utilizando el software Adobe Photoshop.

#### *Histología hepática*

La esteatosis hepática se evaluó mediante tinción con Oil Red O de las secciones hepáticas. Las secciones congeladas se cortan en un criostato y se fijan en paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, las secciones se tratan durante 2-5 minutos con isopropanol y se tiñen con Oil Red O durante 20 minutos. Oil Red O se preparan diluyendo una solución madre (0,3 g de Oil Red O en 100 ml de isopropanol) con agua (3:2) seguido de filtración. Después de la tinción con Oil Red O, las secciones se lavaron varias veces en agua y se tiñeron con hematoxilina y eosina para resaltar los núcleos de los hepatocitos. Finalmente, se fotografiaron las secciones y se realizó la cuantificación asistida por computadora de la positividad de Oil Red O después de restar el fondo utilizando el software Adobe Photoshop.

#### *Inmunohistoquímica para marcadores inflamatorios en las secciones hepáticas*

Las secciones hepáticas se incubaron durante la noche a 48 °C con anticuerpos primarios contra varios marcadores inflamatorios (por ejemplo, TNF $\alpha$ , Cd68, II-6, II-1b e II-12). Las secciones se enjuagaron en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado y luego con un complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa (sistema de detección de gran volumen Ultravision antipolivalente, Lab Vision, Fremont, CA, EE. UU.). El producto de reacción se desarrolló con tetrahidrocloruro de 3',3'-diaminobencidina como cromógeno (Sigma-Aldrich). Los experimentos de control se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Los portaobjetos se evaluaron y fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Microphot-FXA. La cuantificación asistida por computadora de la tinción contra marcadores inflamatorios se realizó después de la sustracción de fondo utilizando el software Adobe Photoshop.

#### *Aislamiento, caracterización y diferenciación de preadipocitos de grasa visceral de conejo*

El aislamiento de preadipocitos de conejo (rPAD) del VAT se llevó a cabo como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). En resumen, las muestras de VAT se digieren con 1 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Sigma-Aldrich) durante 1 h, se tratan con tampón de lisis de glóbulos rojos (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM y EDTA 0,1 mM; 10 min a RT), luego se centrifugan a 2000 g durante 10 min a RT, se volvieron a suspender en un medio completo (DMEM que contiene suero bovino fetal al 10 % (FBS), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, L-glutamina 2 mM y 1 mg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich) y se filtran a través de un filtro de malla de 150 mm para eliminar los desechos. Finalmente, las células se cultivaron en un medio de cultivo completo a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95 % de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Se obtiene una población celular subconfluente (90 % de la placa de cultivo celular) y homogénea similar a fibroblastos en el pase 0 (P0) después de 4-5 días de cultivo. Las células subconfluentes se tripsinizan y se sembraron en placas de cultivo celular (P1). Para todos los experimentos, solo se utilizan cultivos P1, y los experimentos se repiten utilizando al menos tres preparaciones de rPAD diferentes para cada grupo experimental. Los rPAD se caracterizan por citometría de flujo con los siguientes anticuerpos monocionales conjugados: CD34-PE, CD45-FITC, CD31-FITC, CD14-PE, CD90-PE, CD106-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) y CD105-PE (Ancell, Bayport, MN, EUA), como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). La diferenciación de rPAD, 2 días después de la confluencia (tiempo 0), se indujo exponiéndolos a una mezcla de diferenciación (DIM), que contenía 5 mg/ml de insulina, dexametasona 1 mM y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX) en DMEM complementado con FBS separado al 5 % durante 8 días. El medio de cultivo se reemplazó cada 48 h, y luego las células se cambiaron a un medio que contenía 5 mg/ml de insulina durante 48 h.

#### *Captación de glucosa*

La captación de glucosa por rPAD se midió como se describió anteriormente (Maneschi *et al.* 2012). Los rPAD expuestos a dim se cultivan durante 24 h en un medio sin suero, seguido de incubación en concentraciones crecientes de insulina (1, 5, 10 y 50 nM) diluida en tampón de fosfato de Krebs sin glucosa (2,5 mmol de Ca<sub>2</sub>C y 1 mg/ml de BSA), para evaluar la estimulación dependiente de insulina. Al final del período de incubación, los rPAD se incuban adicionalmente con <sup>3</sup>H-2-desoxi-D-glucosa (16 mM (1mCi/ml); ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EE. UU.) durante 5 min. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con NaOH 0,5 M, y la radiactividad incorporada se midió por espectrometría de centelleo utilizando un contador  $\beta$  (Perkin-Elmer). Los datos se normalizaron en cuanto al contenido de proteínas.

#### *Análisis estadístico*

5 Los resultados se expresan como medias + S.E.M. para n experimentos como se especifica. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA unidireccional seguida del análisis *post hoc* de Tukey-Kramer para evaluar las diferencias entre los grupos, y P<0,05 se consideró significativo. Las correlaciones se evaluó utilizando el método de Spearman, y el análisis estadístico se realiza con el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS, Inc.) para Windows 15.0. Se aplican regresiones lineales múltiples escalonadas para el análisis multivariante, cuando corresponda. Los valores de concentración efectiva de respuesta semimáxima (EC<sub>50</sub>) y los valores de efecto máximo (E<sub>máx.</sub>) se calculan utilizando el programa informático ALLFIT.

10 **Ejemplo 11:** Evaluar los efectos de los artículos de prueba en modelos animales

15 *Animales de experimentación y dietas*

15 Los animales se alojaron de forma individual en jaulas estándar a 22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Los ratones macho C57BL6 (B6) o *Lep<sup>ob</sup>/Lep* ob de ~7 semanas se compraron en The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME). Las dietas de prueba provenían de Research Diets (New Brunswick, NJ). Para inducir NASH, se prueba una dieta compuesta por alto contenido de grasa (40 % kcal) y alto contenido de fructosa (22 % en peso), donde la fuente de grasa es la grasa trans (manteca de aceite vegetal parcialmente hidrogenada Primex, n.º de cat. D09100301). Como dieta de control se utilizó una dieta baja en grasas (10 % kcal/grasa) sin fructosa ni colesterol (n.º de cat. D09100304). La dieta HTF se considera superior en la inducción de NASH y se utiliza en estudios posteriores.

20 *Estudios y administración de fármacos*

25 Para caracterizar el desarrollo de NASH en estas dietas, se mantuvo a los ratones *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* o B6, ya sea con una dieta baja en grasas (LFD), la dieta alta en grasas trans, alta en fructosa, alta en colesterol (HTF) o la dieta alta en grasa de cerdo, alta en fructosa, alta en colesterol (HLF) durante 8 o 12 semanas, respectivamente. Los ratones se implantan por vía subcutánea con una única minibomba osmótica (modelo 2004; Alzet, Cupertino, CA) que suministra al vehículo (DMSO al 50 % en agua estéril) o un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente). Además o alternativamente, los ratones podían tener vehículo o una composición farmacéutica de la presente solicitud administrada una vez al día mediante sonda oral. El peso corporal se mide semanalmente. La composición corporal se mide al inicio del estudio (el día antes del implante de la bomba) y al finalizar mediante RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX).

30 35 Para evaluar el impacto de la pérdida de peso corporal en los criterios de valoración hepáticos, se puede repetir el estudio inicial en ratones *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* expuestos a dieta LFD o HTF como se describió de forma repetida. Después de 8 semanas con dieta LFD o HTF, a todos los ratones se les administró por vía oral un compuesto de la presente solicitud (por ejemplo, OCA), junto con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, los descritos en la presente) durante 8 o 12 semanas.

40 45 Al finalizar, se extirpó el tejido hepático y se fijó en formalina tamponada neutra al 10 % (al menos 7 días a temperatura ambiente). El tejido hepático se incorporaría en parafina, seccionó, montó y tiñó con hematoxilina y eosina. Para visualizar la fibrosis, se tiñe otro conjunto de secciones con Sirius Red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las secciones se tiñen primero con hematoxilina de hierro de Weigert, seguido de escarlata de Biebrich, ácido fosfotungstico/fosfomolíbdico y tratamiento con azul de anilina. Un segundo conjunto de secciones se inmunotíñen utilizando un anticuerpo dirigido al marcador de macrófagos Mac-2 (Cedarlane Laboratories, Burlington, NC), de acuerdo con los protocolos estándar. Todos los análisis histológicos son realizados por un patólogo ciego a las condiciones de tratamiento.

50 55 El lípido hepático total se extrae del hígado utilizando un protocolo adaptado de Folch *et al.* (J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)). Se homogeneizan aproximadamente 0,5 g de tejido hepático congelado en 10 ml de solución de cloroformo/metanol 2:1. El homogeneizado se filtra utilizando papel libre de grasa y se canaliza en un tubo de centrífuga de vidrio de 15 ml pesoado previamente. A continuación, se agregan 5 ml adicionales de solución de cloroformo/metanol 2:1, seguidos de 2,5 ml de NaCl al 0,9 %. El extracto filtrado se mezcló posteriormente y se centrifugó a 2000 rpm, 10 °C durante 5 min. La capa acuosa se desechó y el tubo se lavó con nitrógeno hasta que el sedimento lipídico estaba seco. Se volvió a pesar el tubo que contenía el sedimento lipídico y se calculó el lípido total extraído por gramo de partida de hígado.

60 65 Para el análisis de transferencia Western, se pesó el tejido hepático extirpado, luego se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta que se procesó. La proteína se aisló de un fragmento de cada hígado de la siguiente manera. El tejido hepático congelado se trituró en hielo seco y luego se homogeneiza en tampón de lisis con inhibidores de proteasa (n.º de cat. 05892791001; Roche Complete Tablets; y PMSF 0,6 mM). La concentración de proteína del sobrenadante aclarado se midió con un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Los lisados de tejido hepático (50 µg) se separaron en geles Nupage reducidos y se transfirieron a membranas de PVDF, siguiendo los protocolos del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las membranas se cortaron entre los marcadores de 50 y 60 kDa y se bloquean con Blotto al 5 %; la mitad superior se sondea con anticáncer, tipo 1 (1:350; n.º de cat. NBP1-30054; Novus Biologicals, Littleton, CO), y para la normalización, la mitad inferior, con anti-GAPDH (1:10.000; peroxidasa de rábano picante conjugada; n.º de cat. 3683; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Después de la incubación con anticuerpo anti-cáncer de peroxidasa de rábano picante, se detecta la expresión de proteínas con quimioluminiscencia

mejorada (Pierce) y se realiza la densitometría utilizando un sistema FluorChem (Cell Biosciences, Santa Clara, CA).

*Expresión génica tisular*

5 Los hígados se extirparon al finalizar, se pesaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron (-80 °C). El ARN total se extrajo usando el reactivo TRI (Ambion, Austin, TX) con columnas RNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA) y el ADNC se generon usando el sistema de transcripción inversa RETROscript RT-PCR (Ambion). PCR cuantitativa en tiempo real (ABI PRISM 7900 Sequence Detection System; Applied Biosystems; Foster City, CA) para genes implicados en la patología de NASH (por ejemplo, genes implicados en esteatosis, inflamación y fibrosis). El ensayo se puede realizar 10 utilizando ensayos de expresión génica Taqman bajo demanda y mezcla maestra de PCR universal (Applied Biosystems).

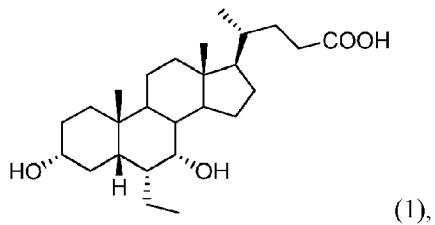
*Análisis de hormonas y metabolitos en plasma*

15 Se midieron los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total, ALT y aspartato aminotransferasa (AST) (por ejemplo, mediante el uso de un bioanalizador Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Center Valley, PA)). Las muestras de plasma se diluyeron 1: 10 con PBS para la detección de ALT y AST dentro del rango de la curva estándar. La adiponectina plasmática total se midió mediante el uso de un ELISA disponible comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA)).

## REIVINDICACIONES

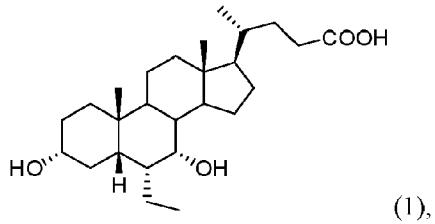
1. Una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR, al menos un agente terapéutico adicional y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables,

5 en donde el al menos un agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida, en donde el agonista de FXR es el Compuesto 1



10 y en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

2. Una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1:

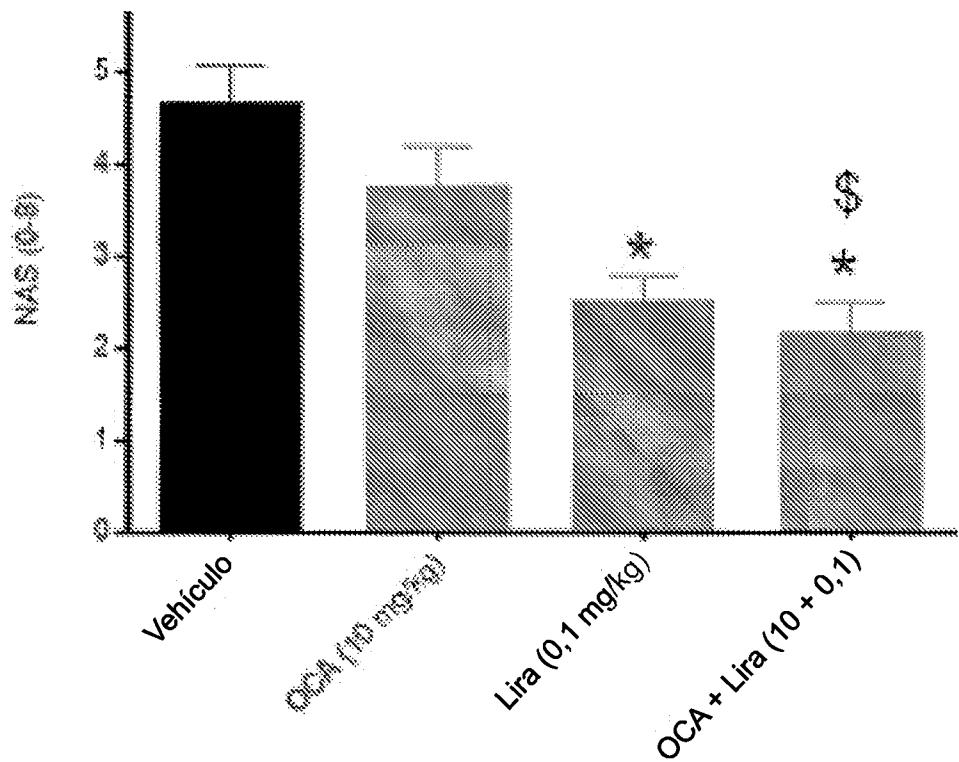
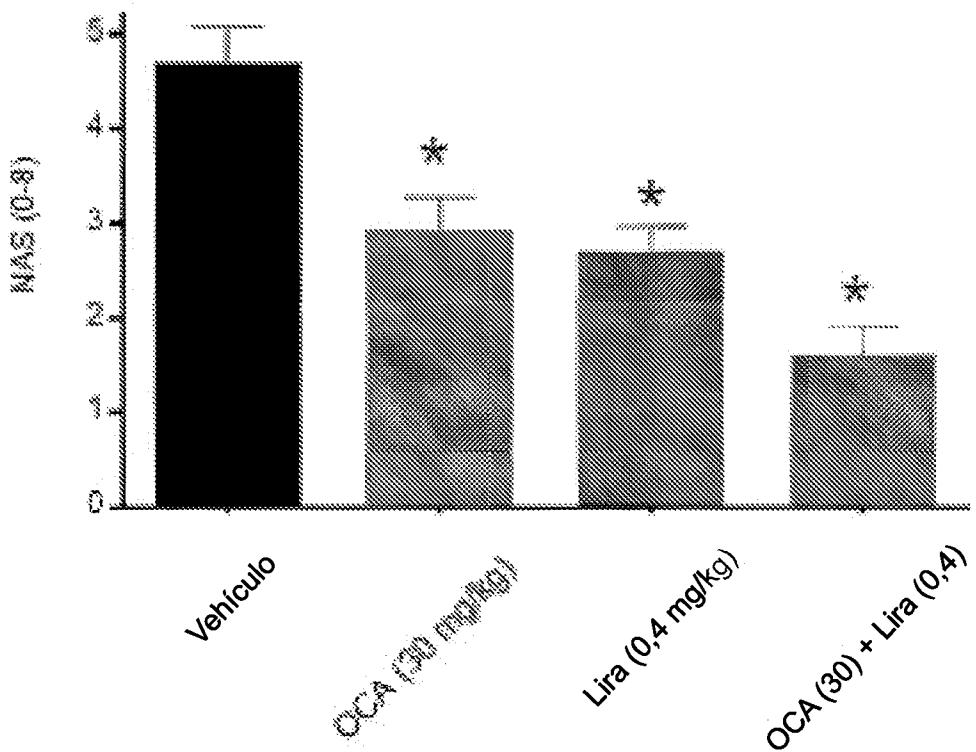


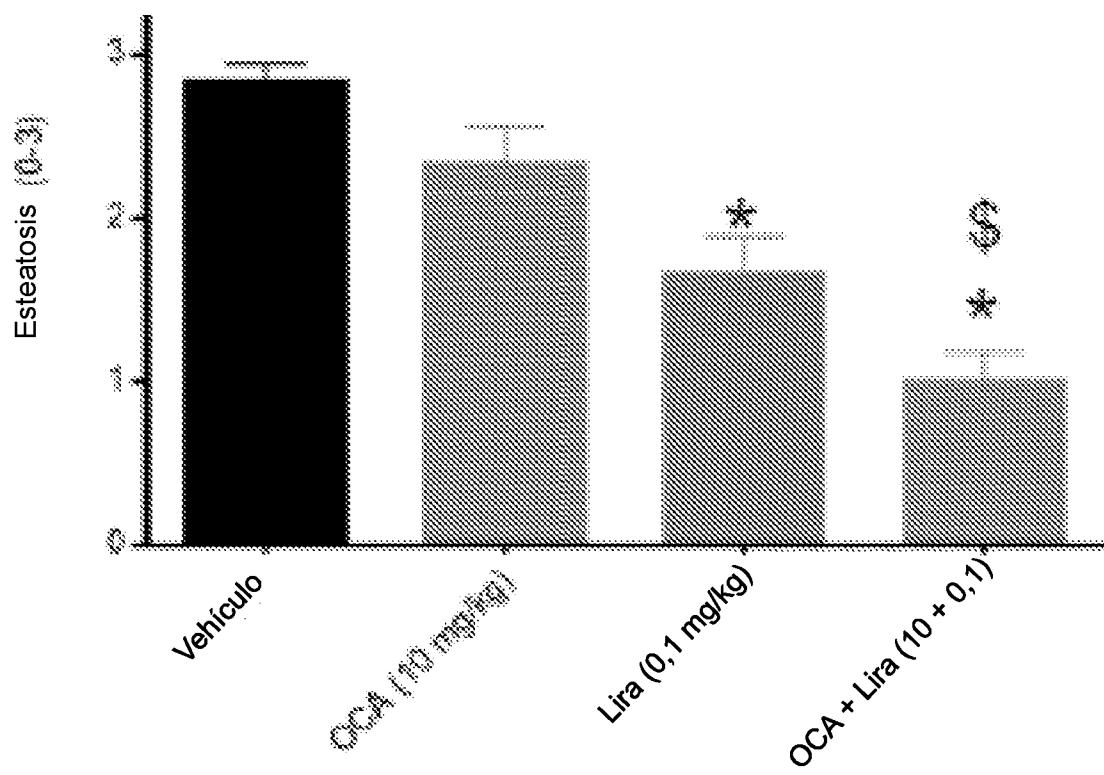
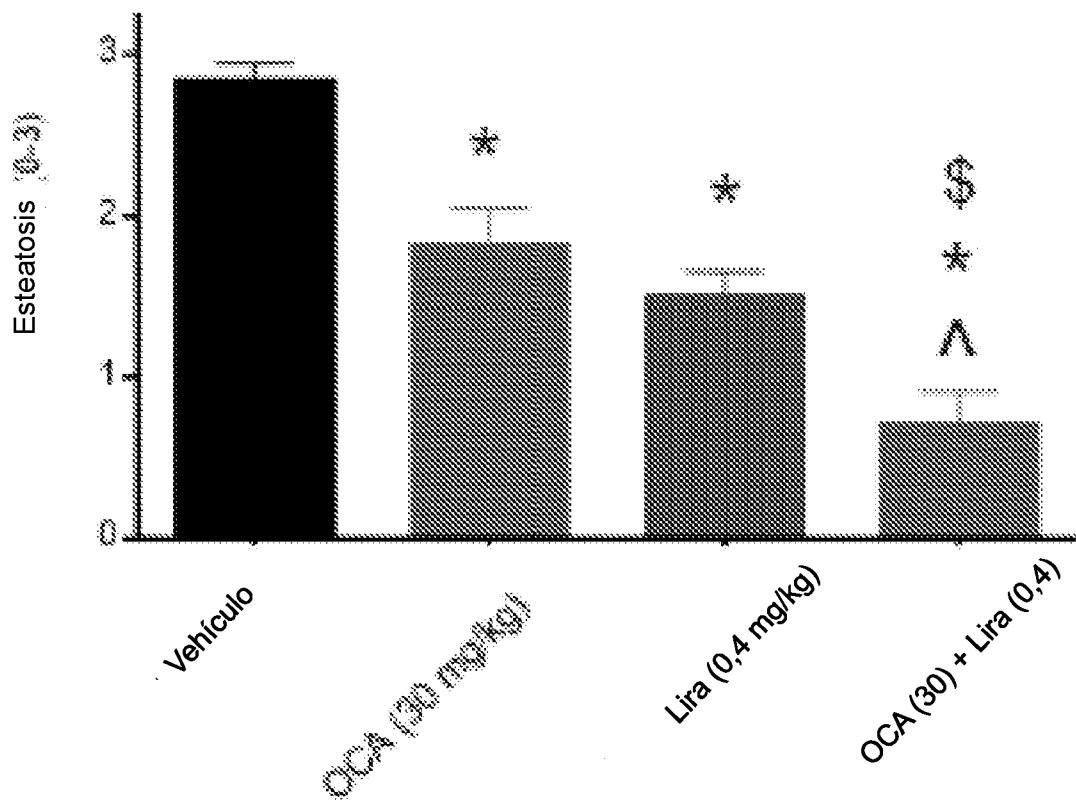
15 (1),  
o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, al menos un agente terapéutico adicional,  
y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde el al menos un agente terapéutico  
adicional es un agonista del receptor de GLP-1 seleccionado de liraglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida y  
20 semaglutida, en donde la composición farmacéutica está en una forma para su administración oral.

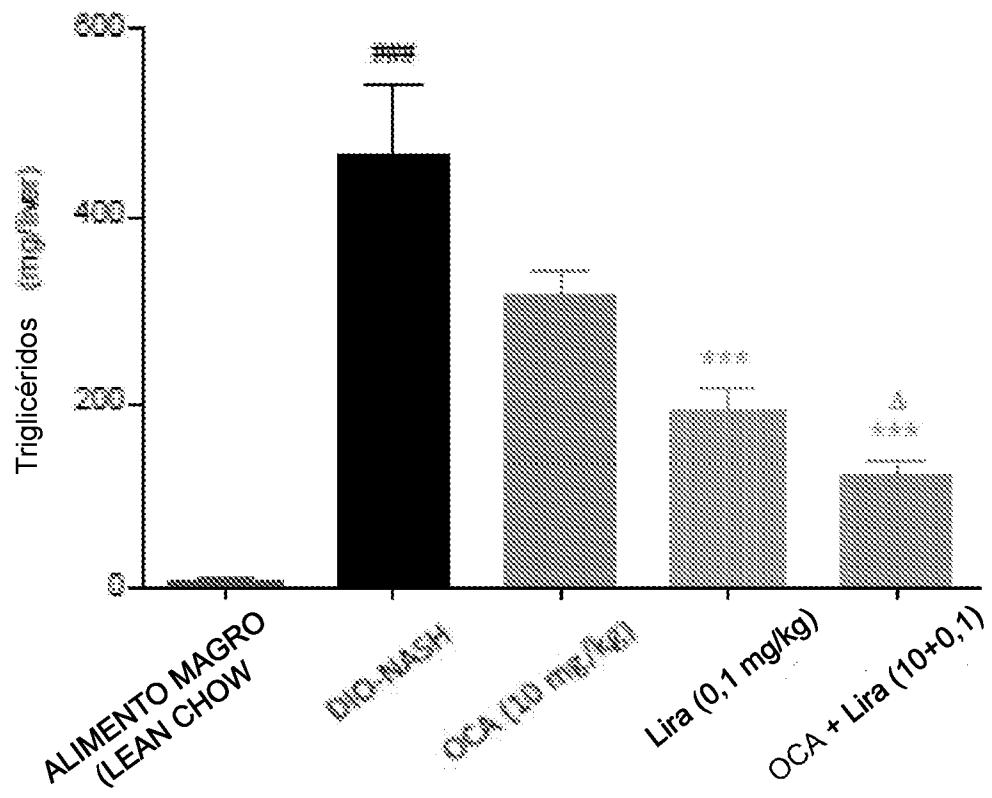
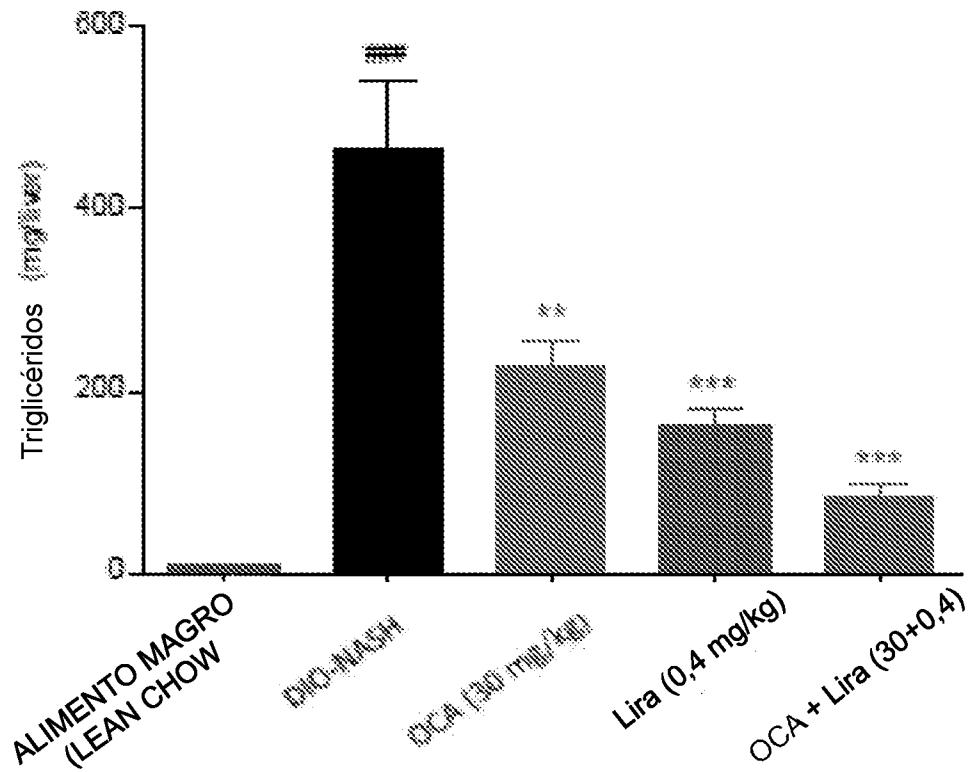
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el agonista del receptor de GLP-1 es liraglutida.

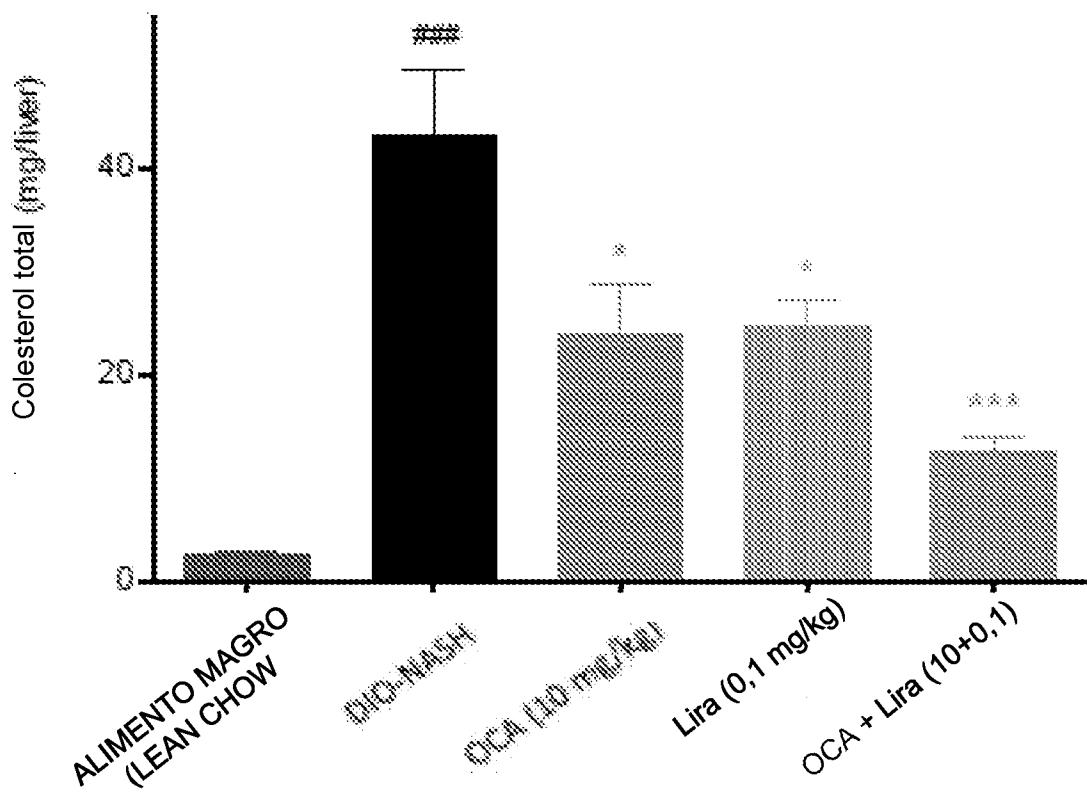
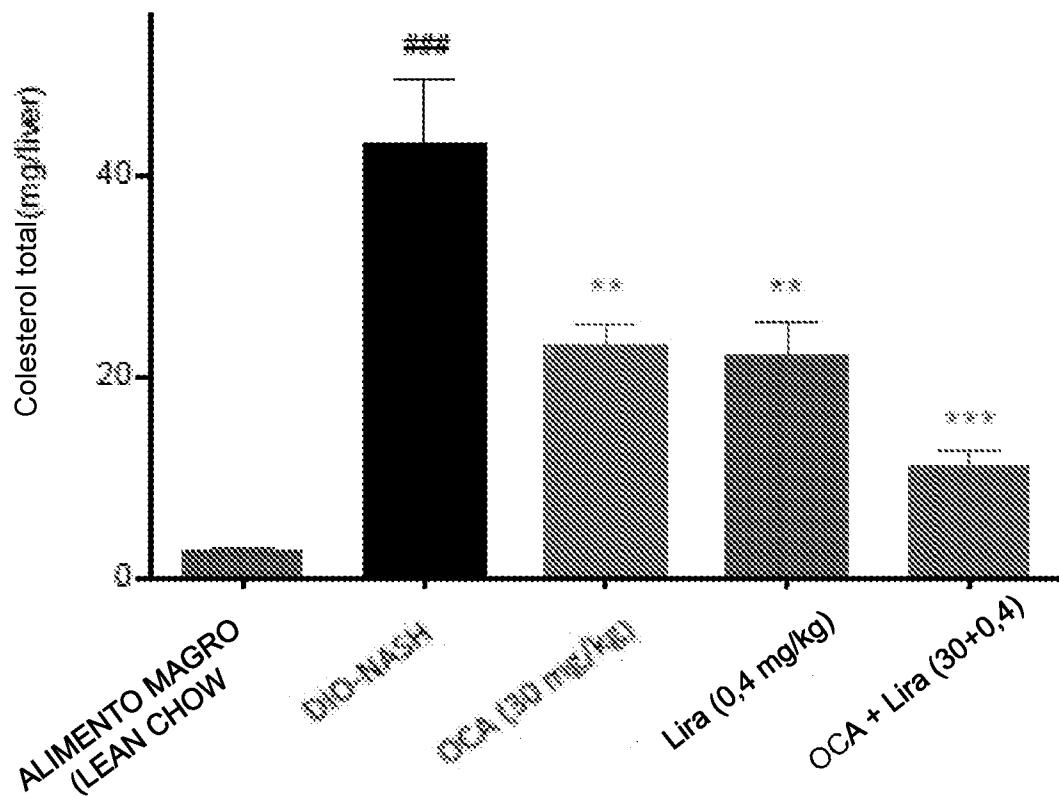
25 4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un método para tratar o prevenir la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

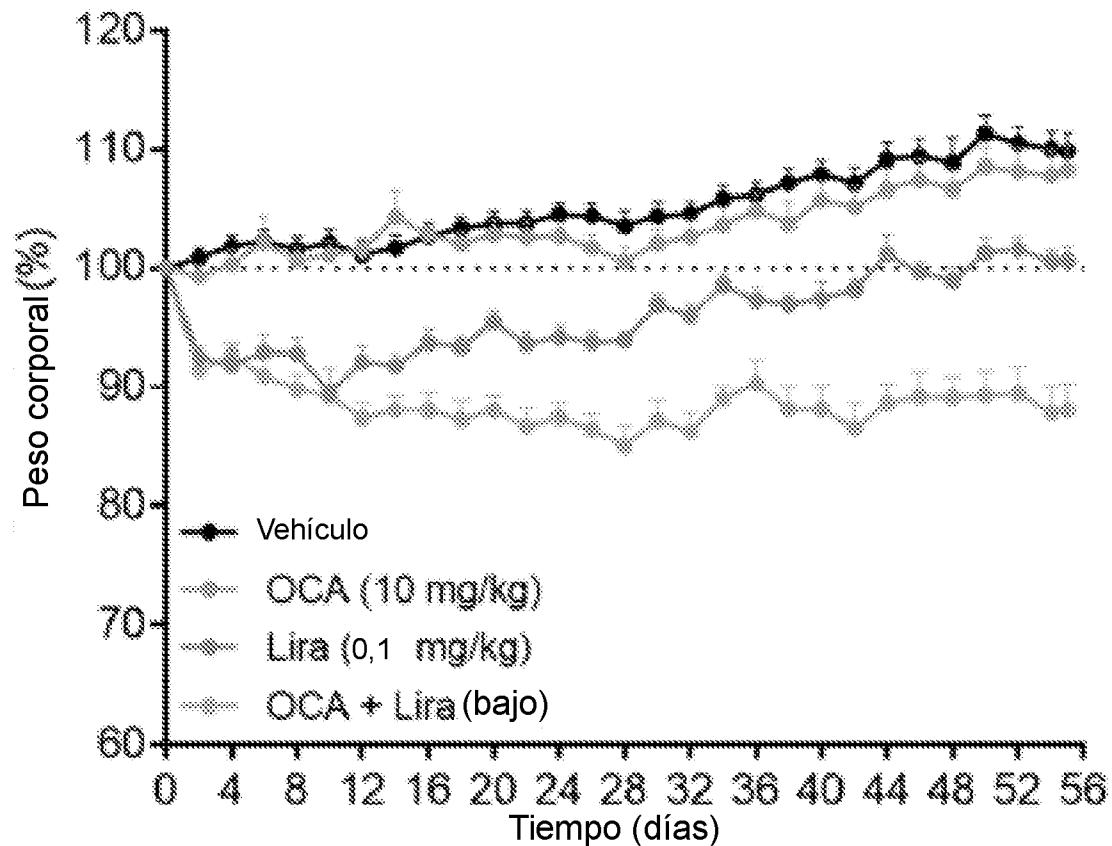
30 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en un método para tratar o prevenir la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

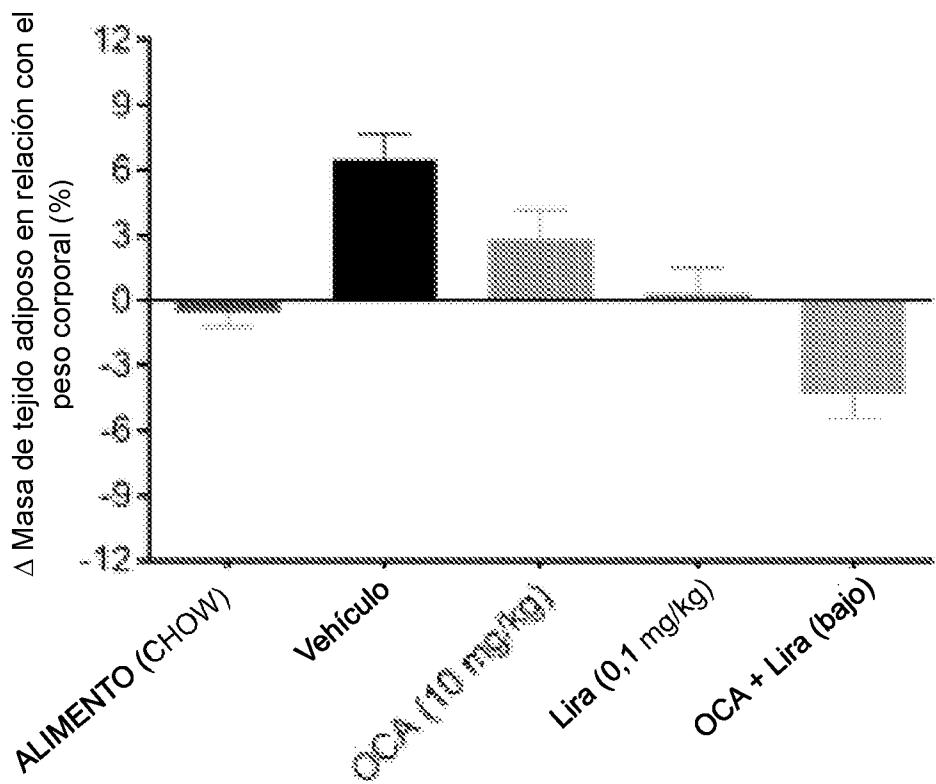
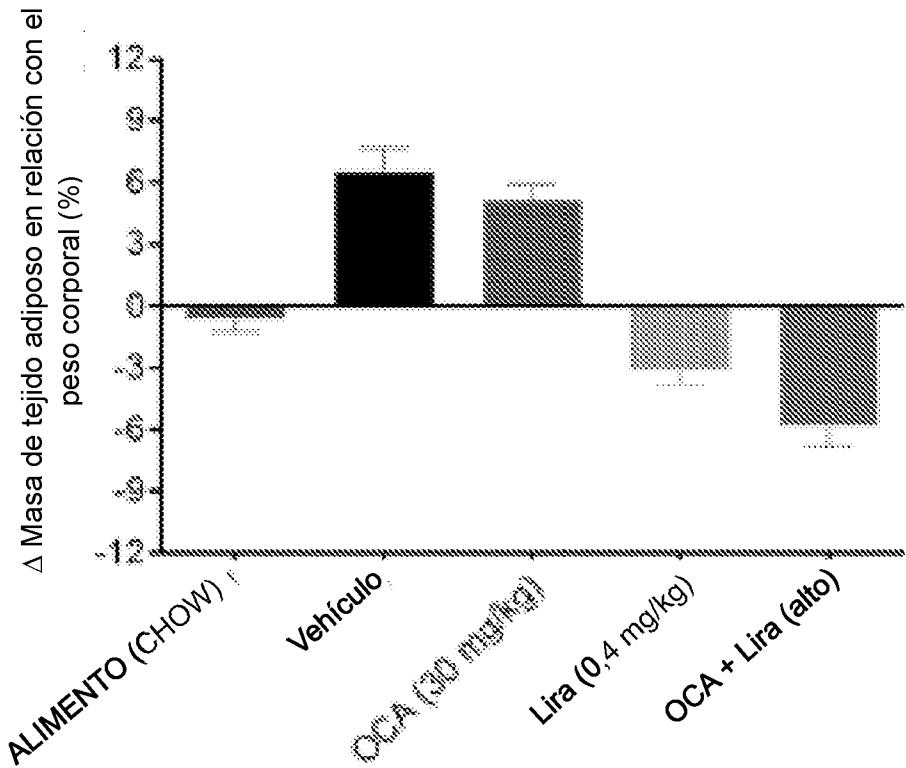
**Figura 1A****Figura 1B**

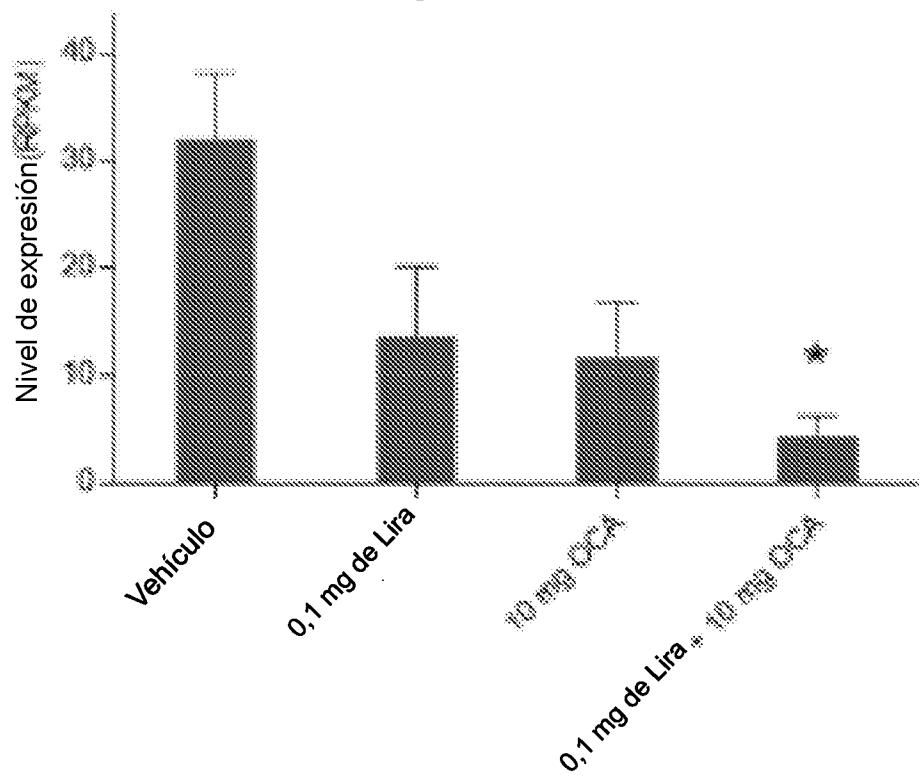
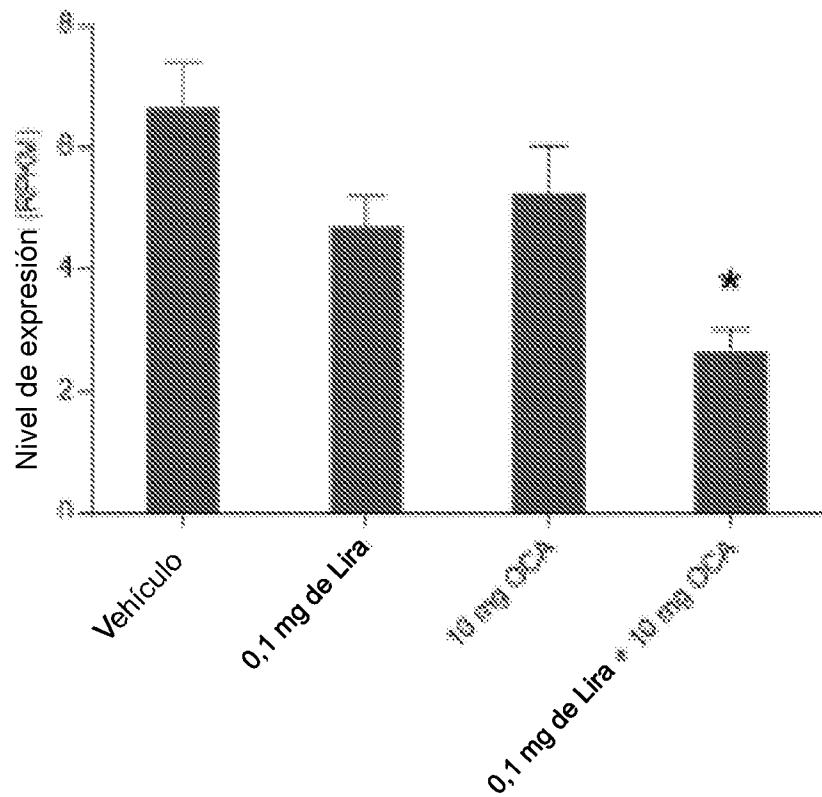
**Figura 2A****Figura 2B**

**Figura 3A****Figura 3B**

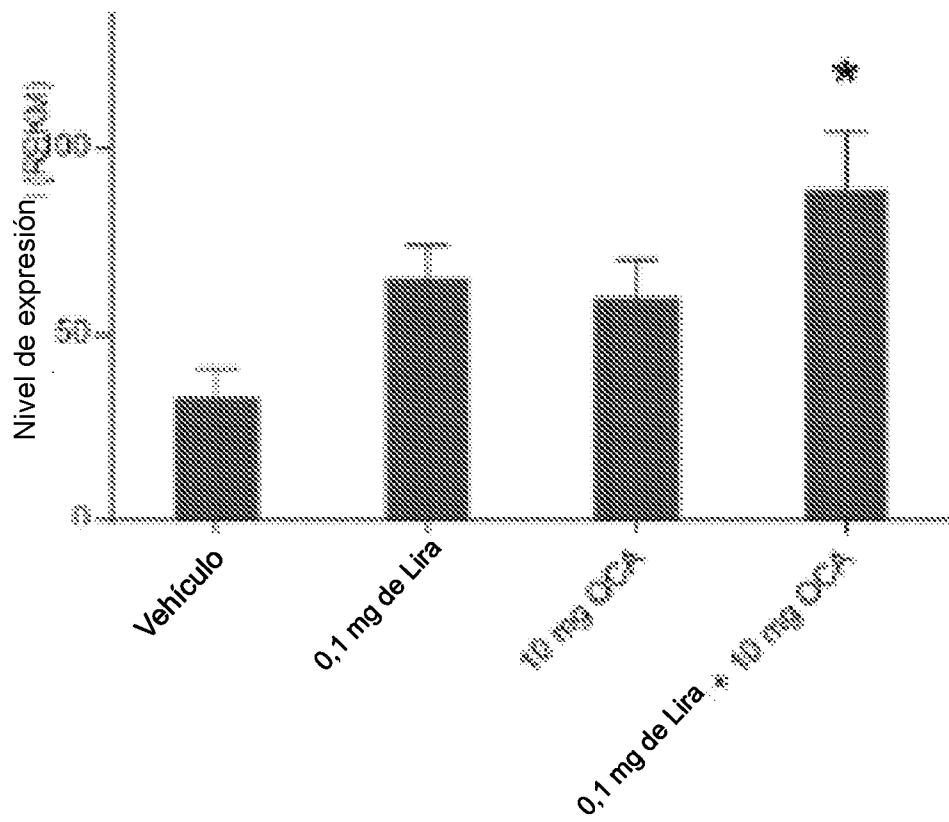
**Figura 4A****Figura 4B**

**Figura 5**

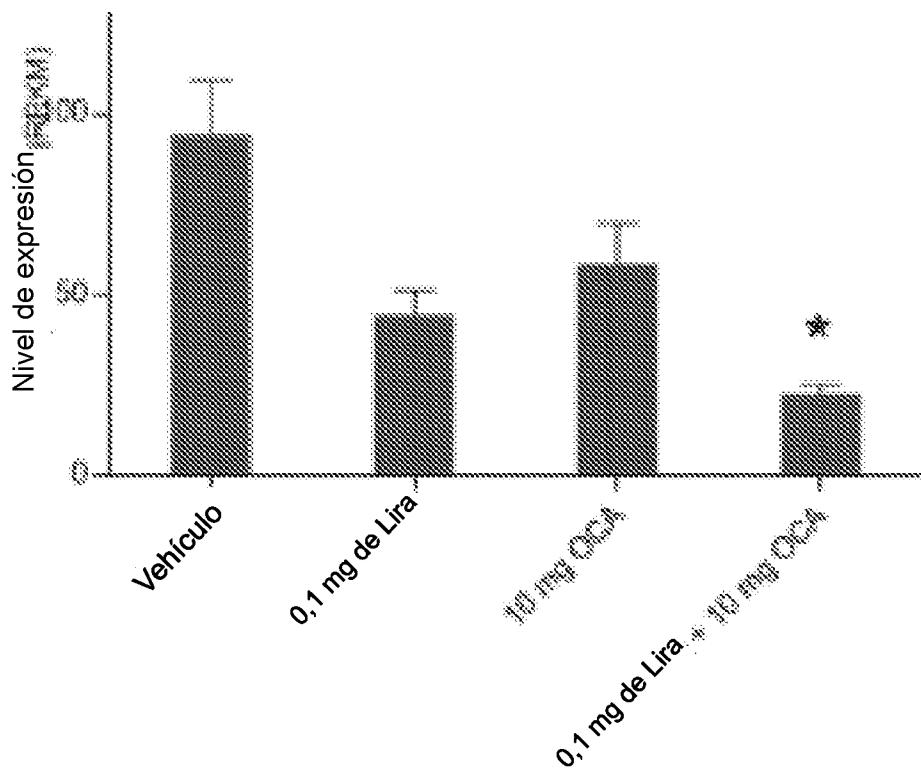
**Figura 6A****Figura 6B**

**Figura 7A****Figura 7B**

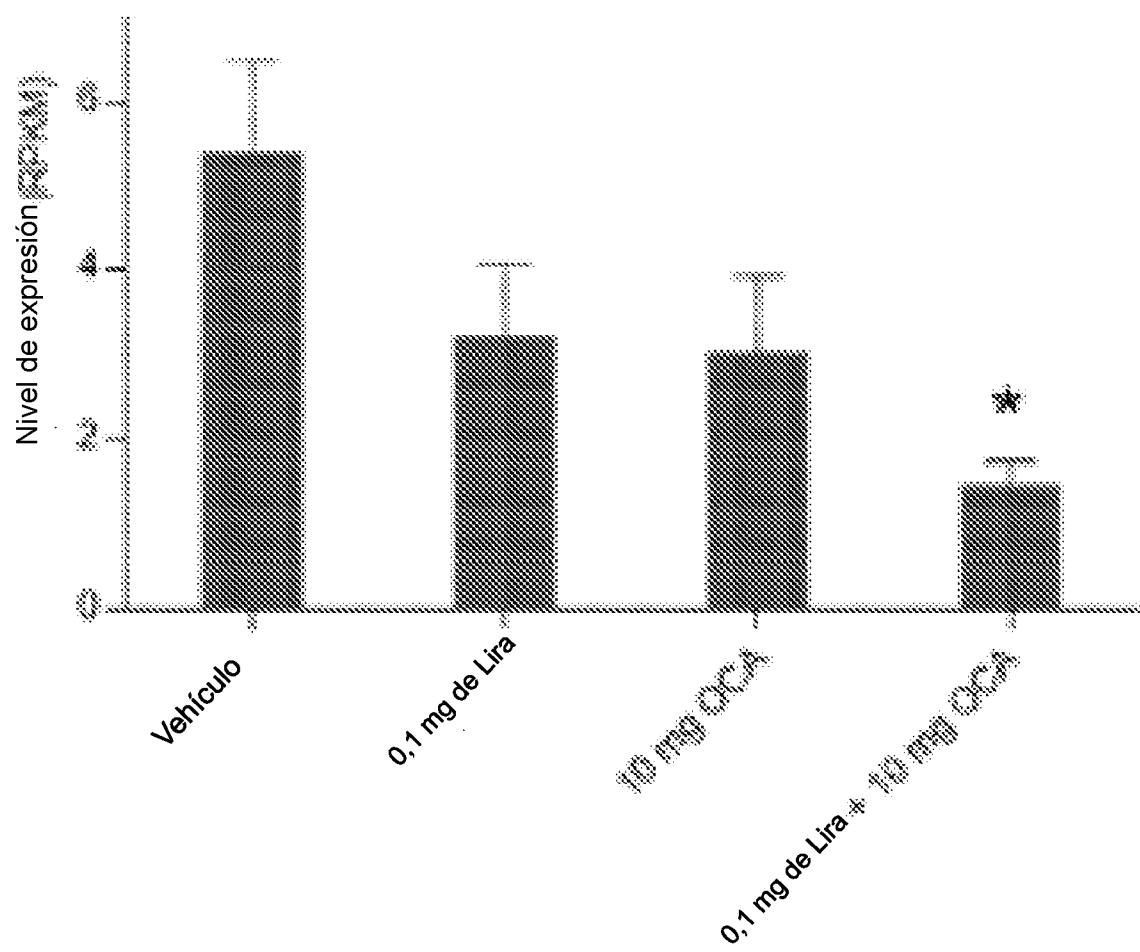
**Figura 7C**



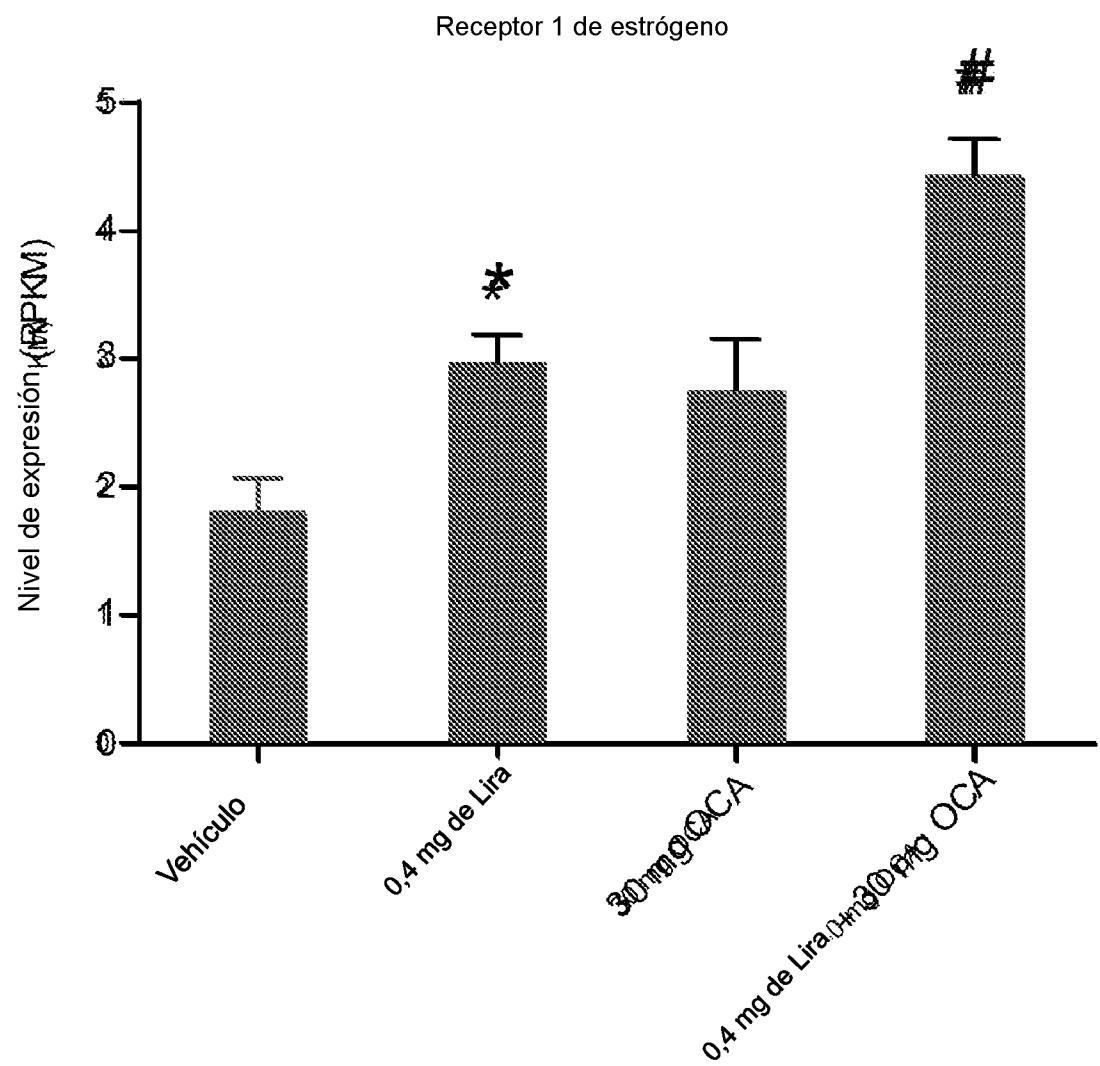
**Figura 7D**



**Figura 7E**

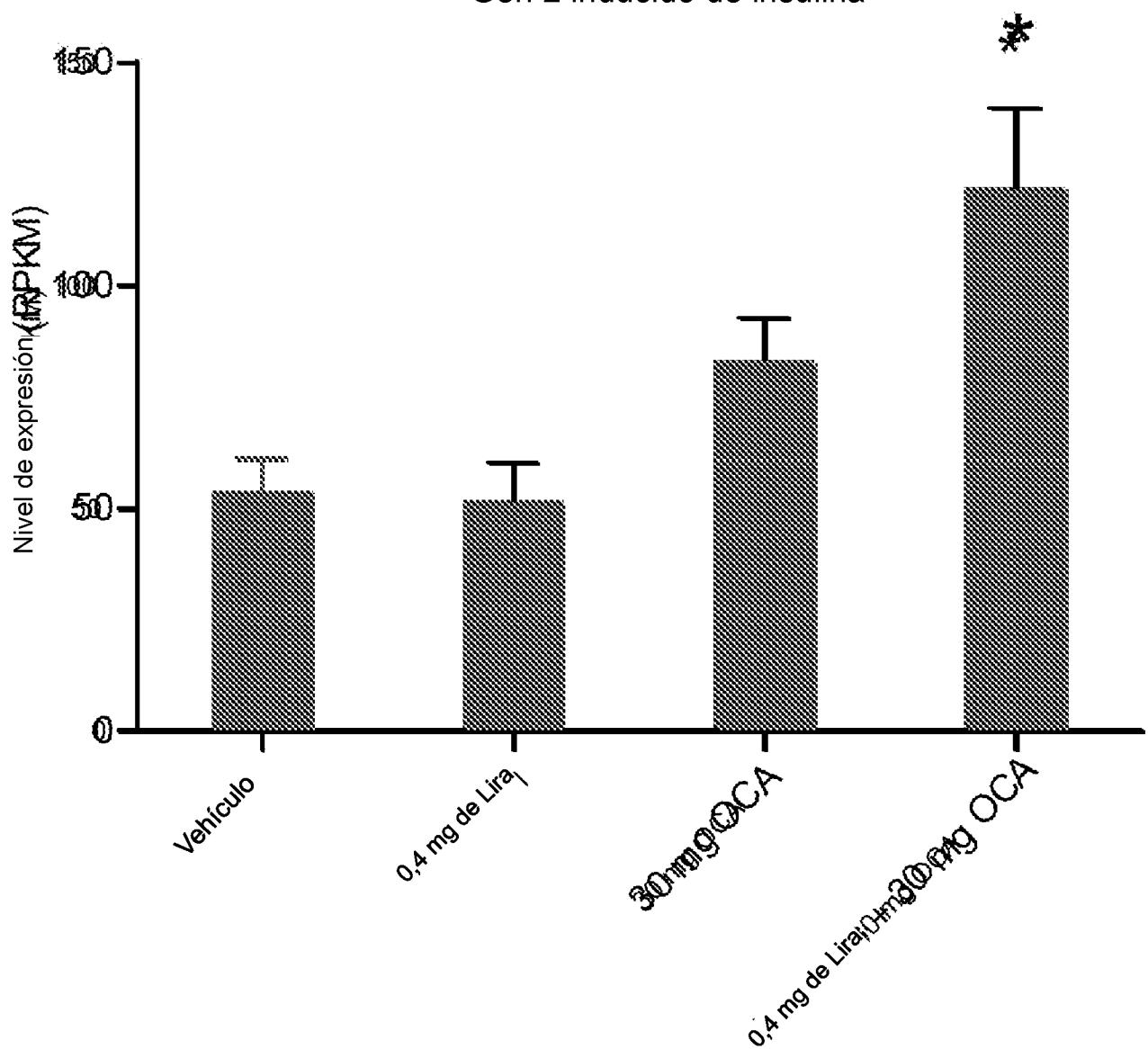


**Figura 8A**



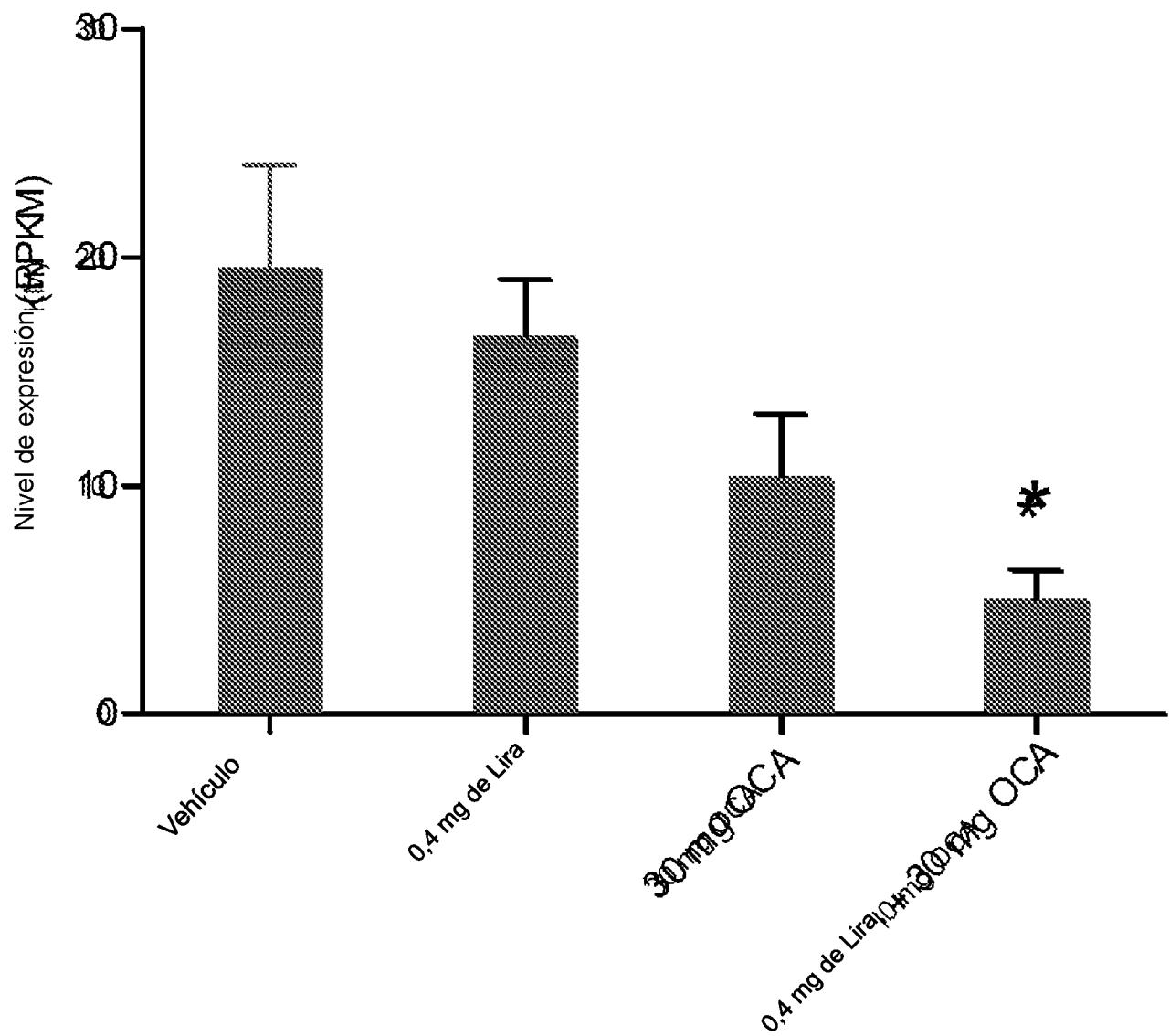
**Figura 8B**

Gen 2 inducido de insulina



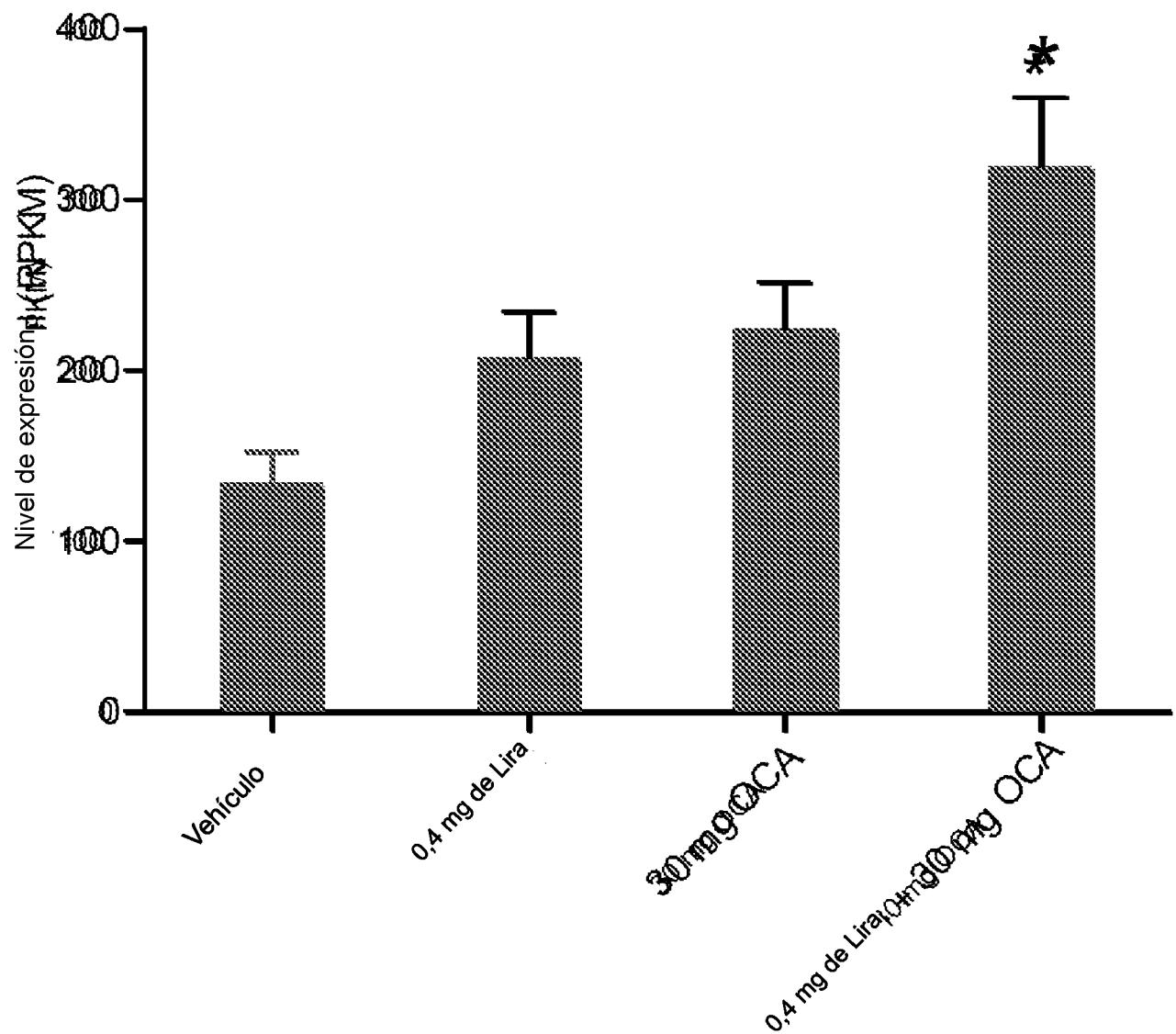
**Figura 8C**

Lipina 1



**Figura 8D**

Proteína bisagra de ubiquinol-citocromo C reductasa



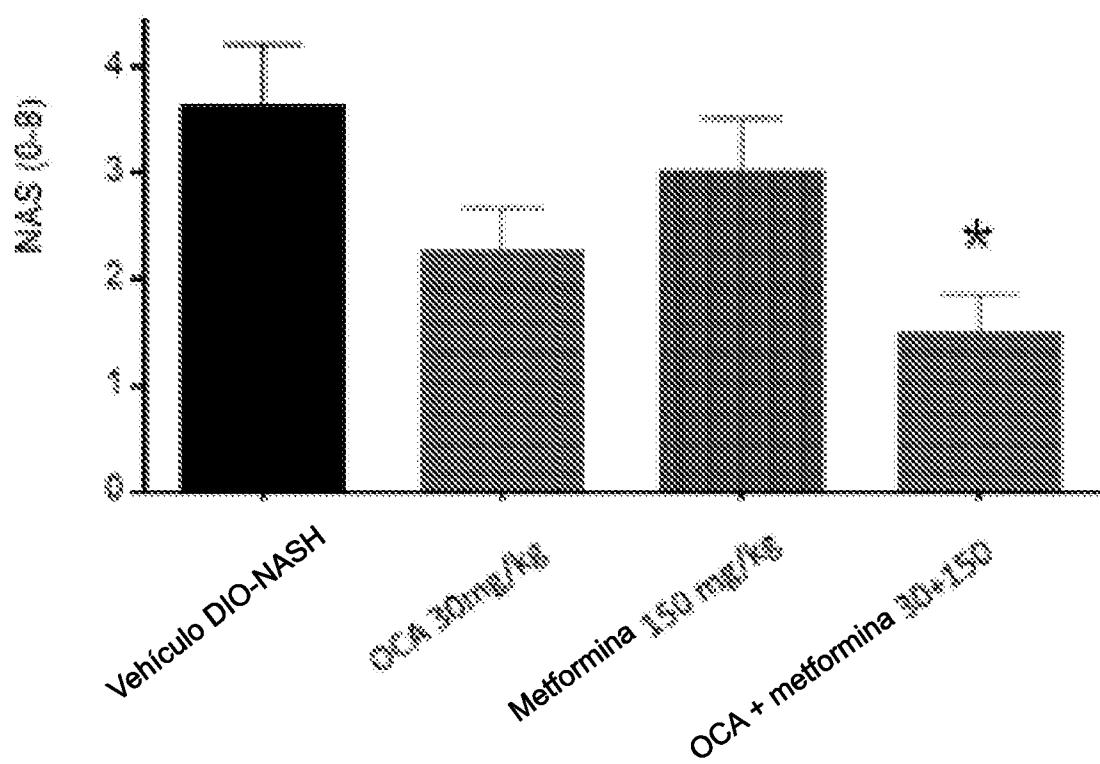
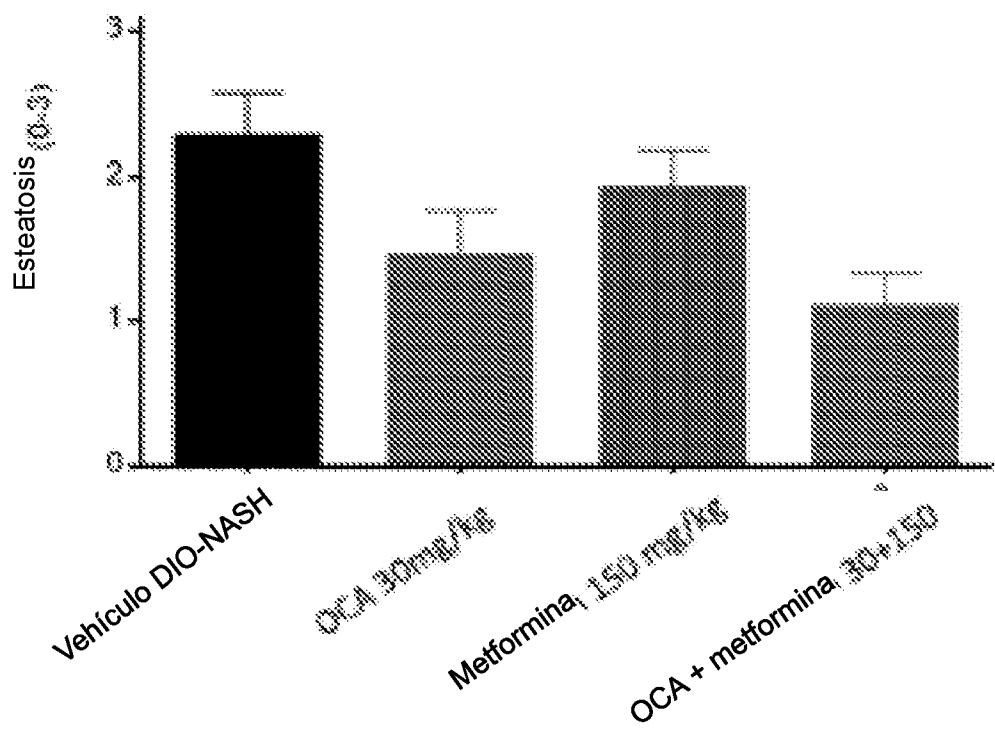
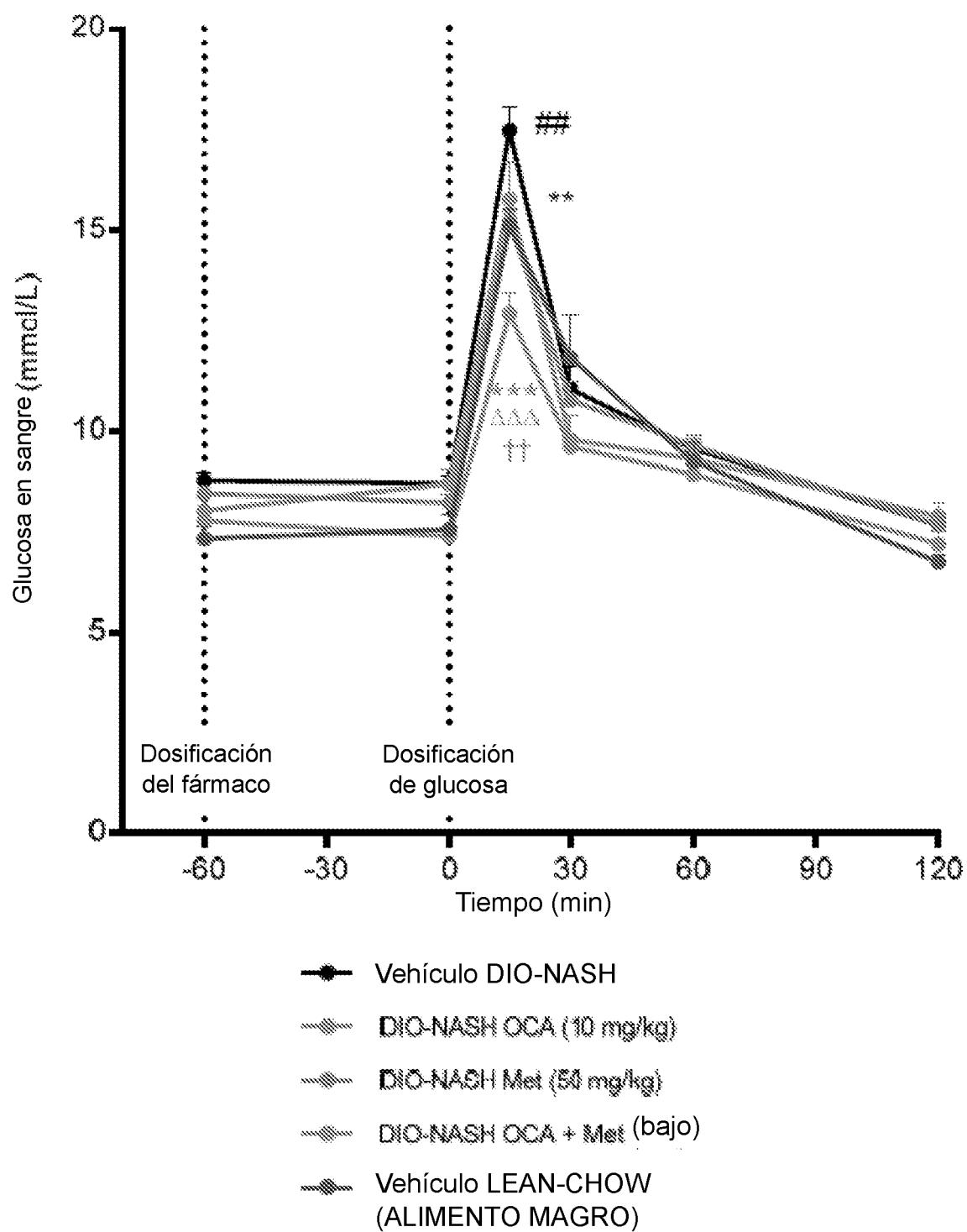
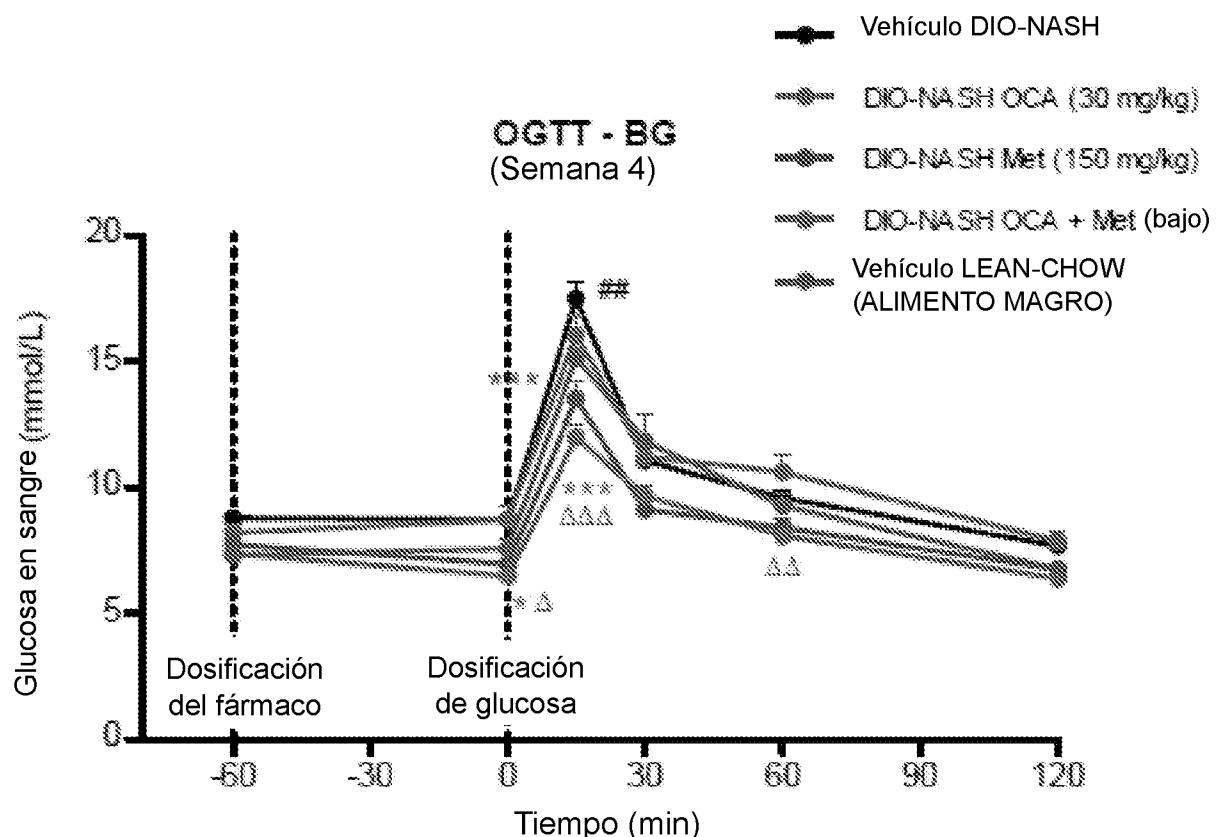
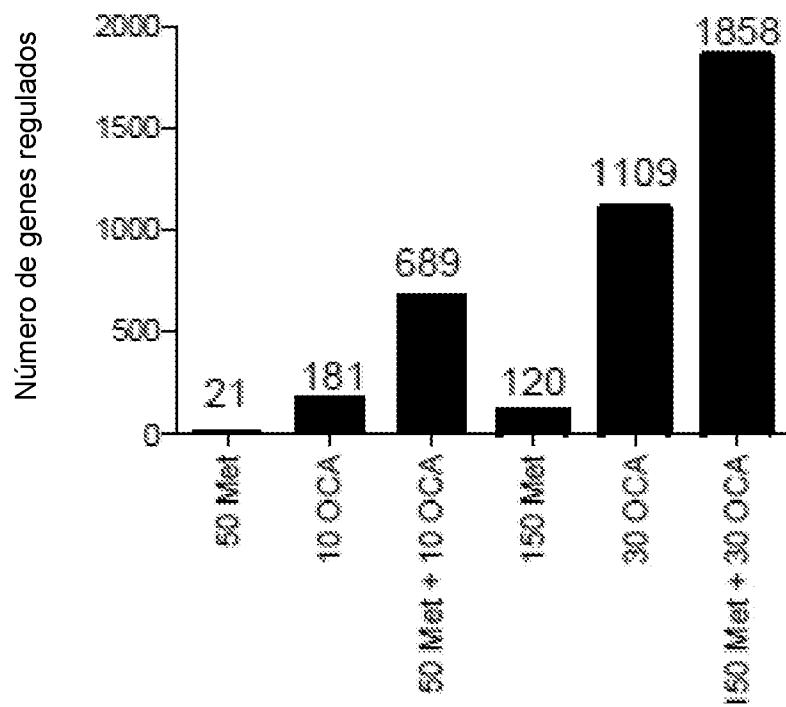
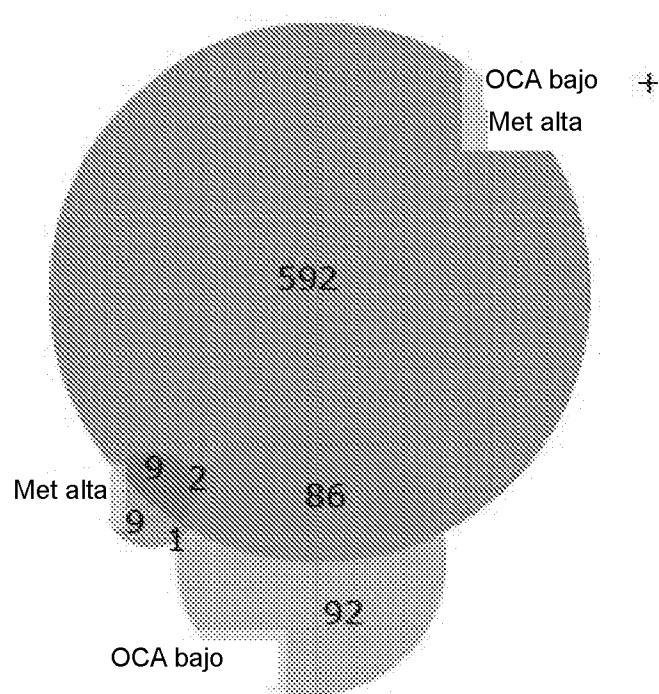
**Figura 9A****Figura 9B**

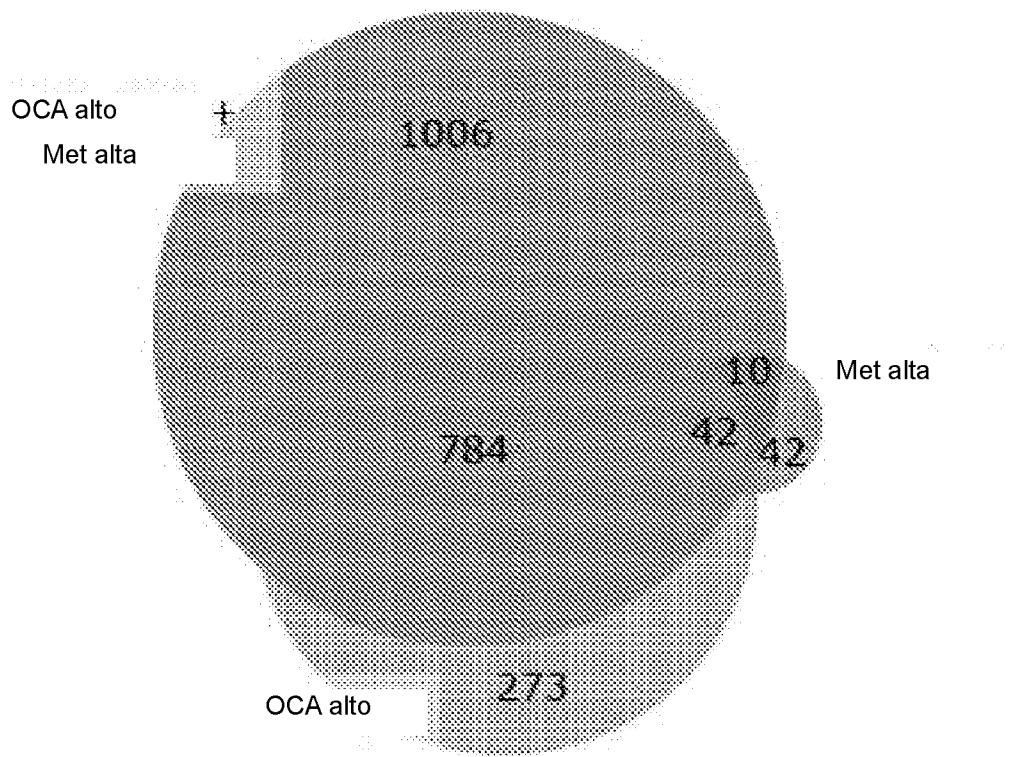
Figura 10A



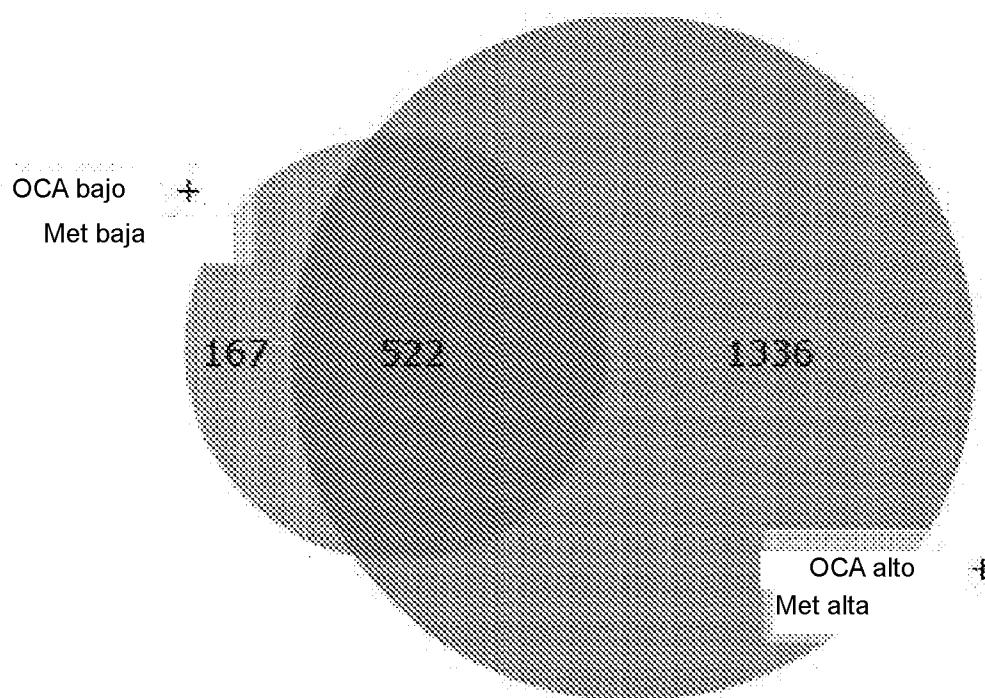
**Figura 10A**

**Figura 11****Figura 12A**

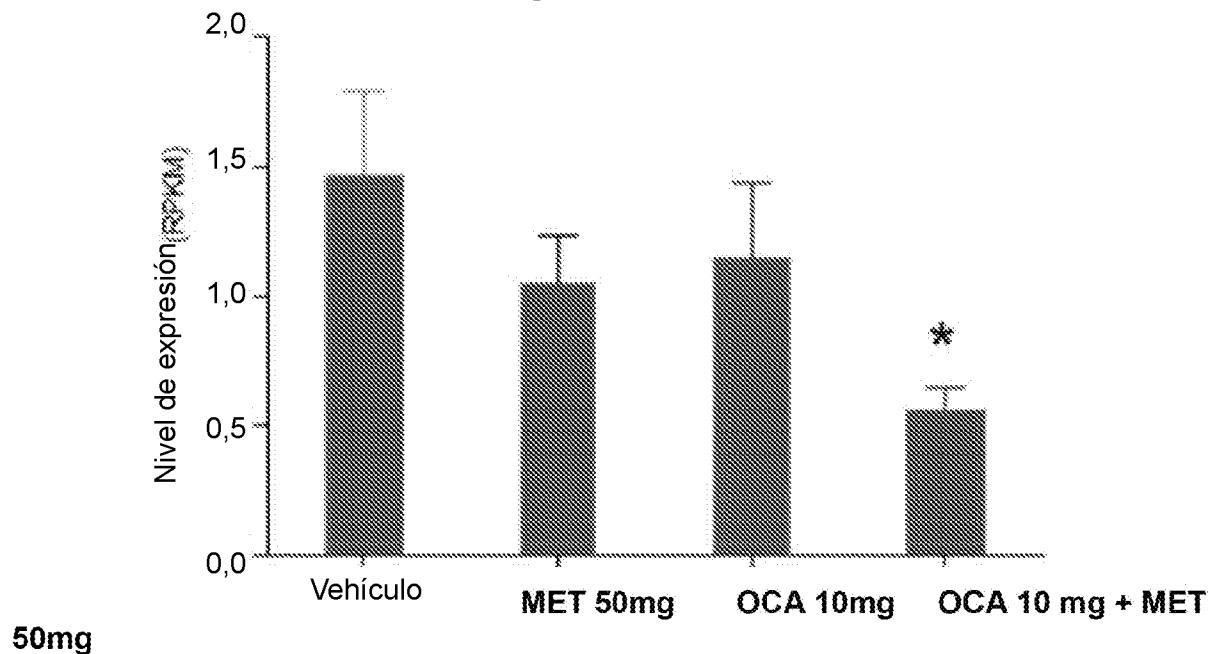
**Figura 12B**



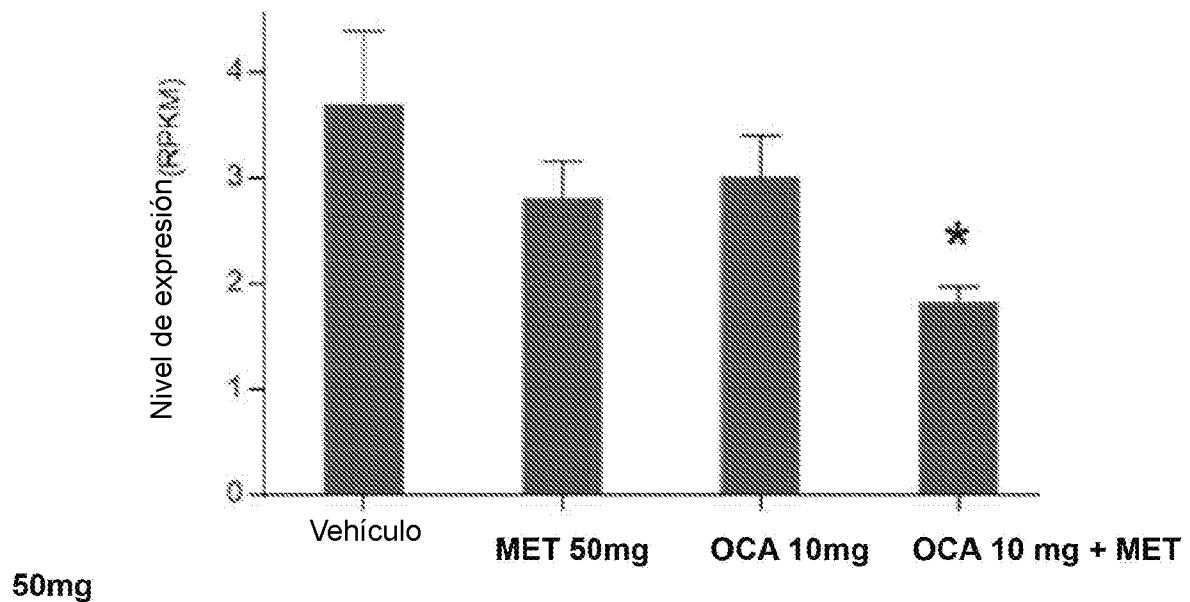
**Figura 12C**



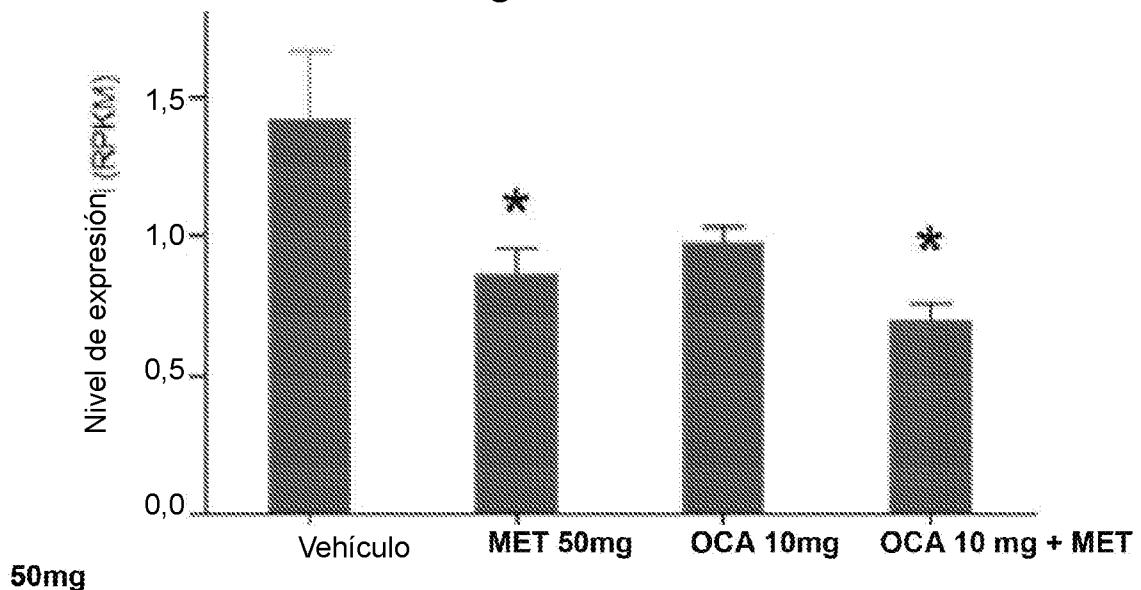
**Figura 13A**



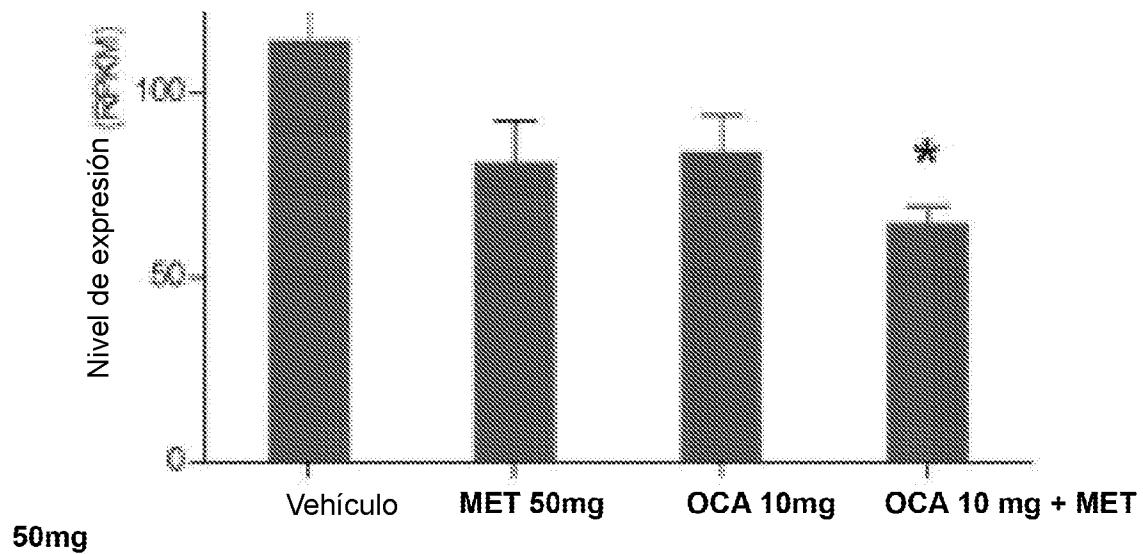
**Figura 13B**



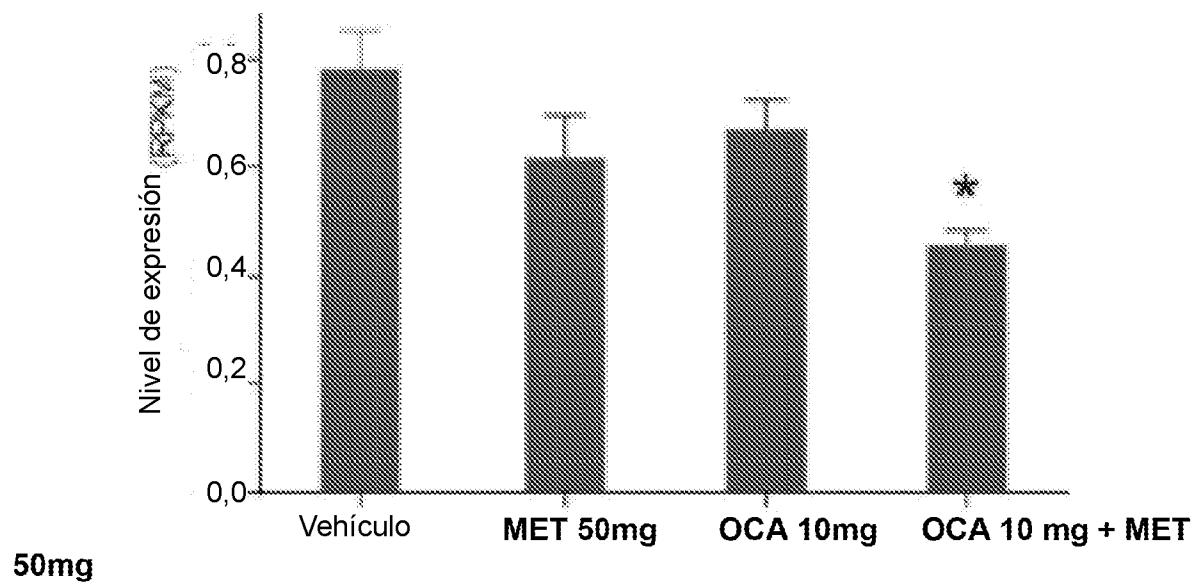
**Figura 13C**



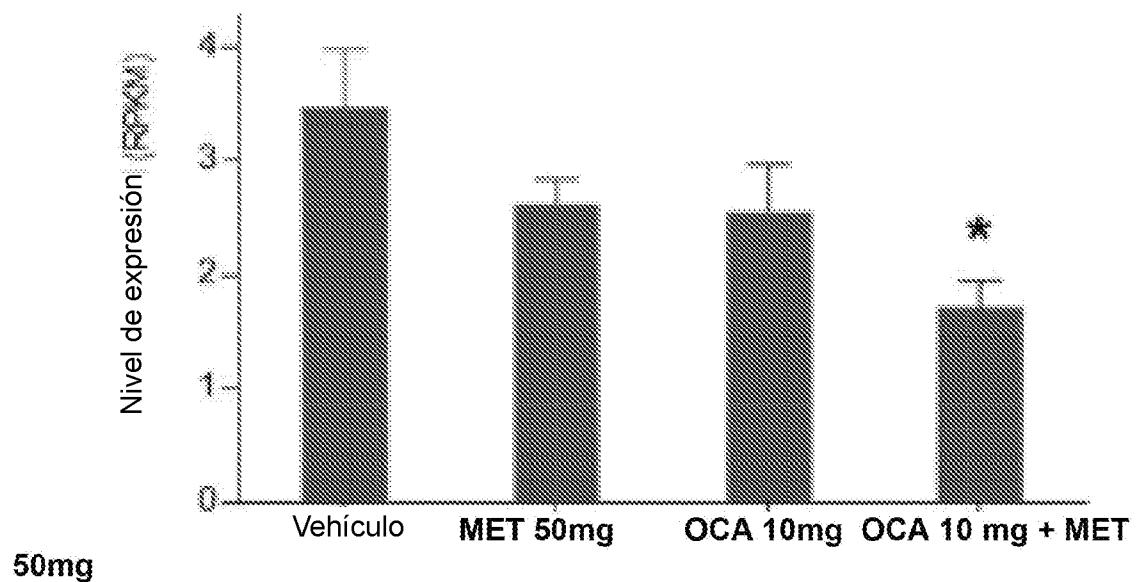
**Figura 14A**



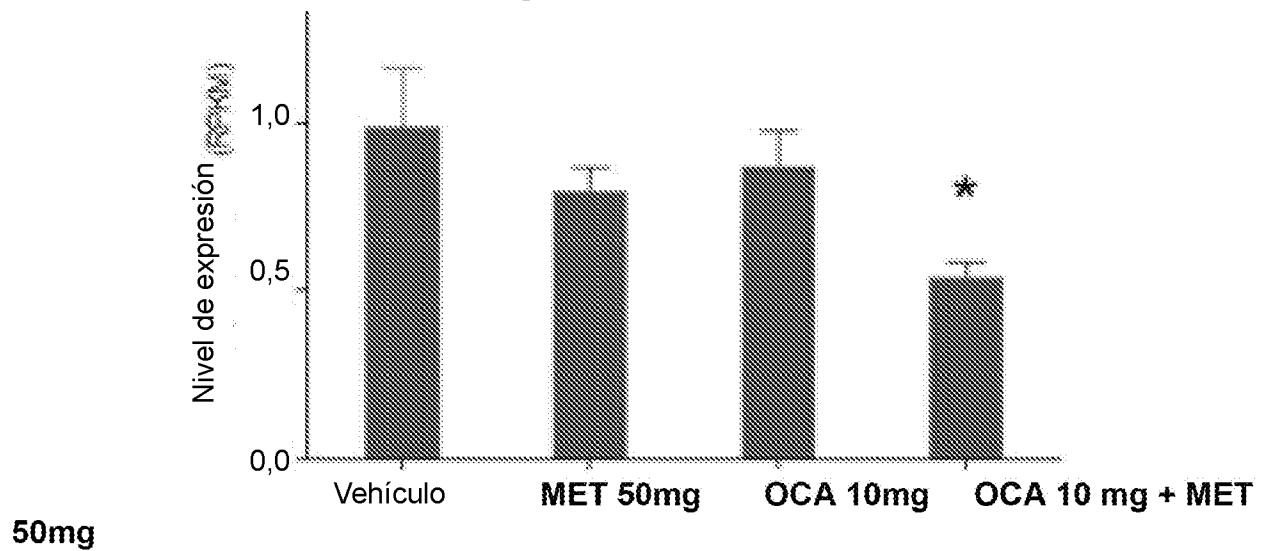
**Figura 13A**



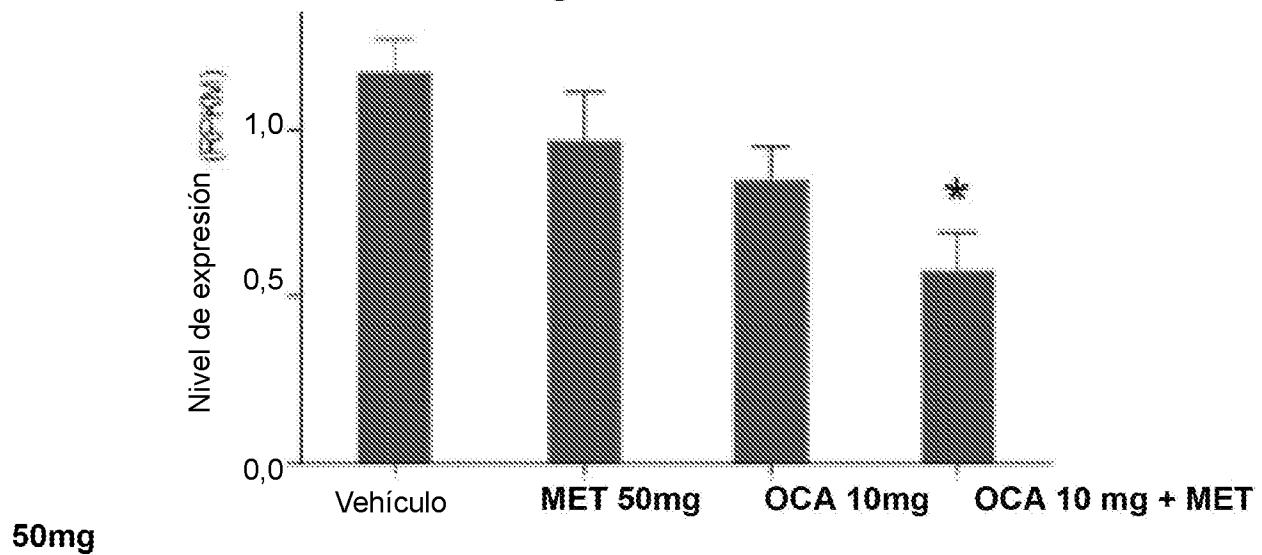
**Figura 14C**



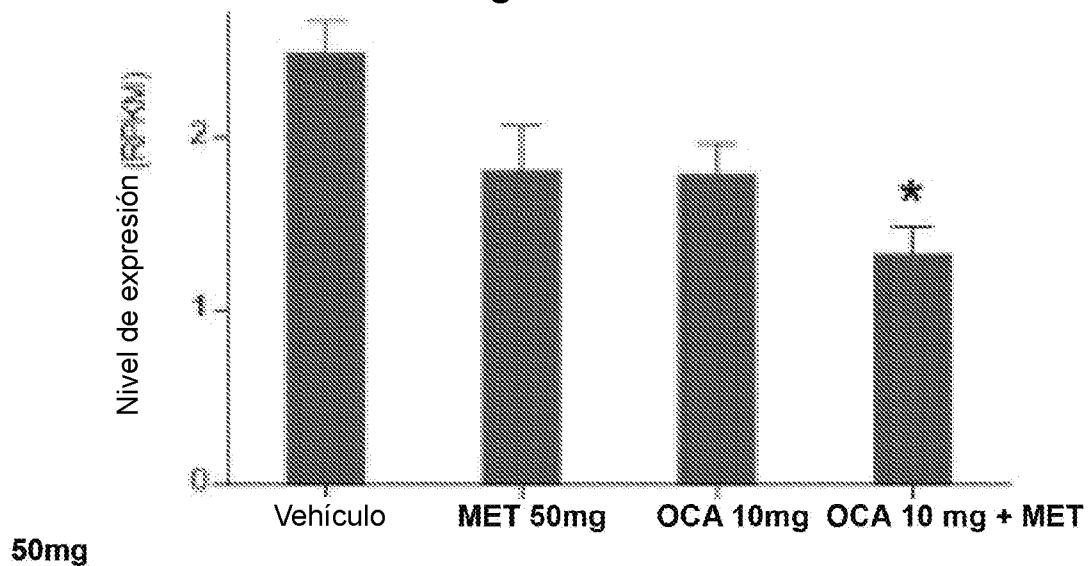
**Figura 14D**



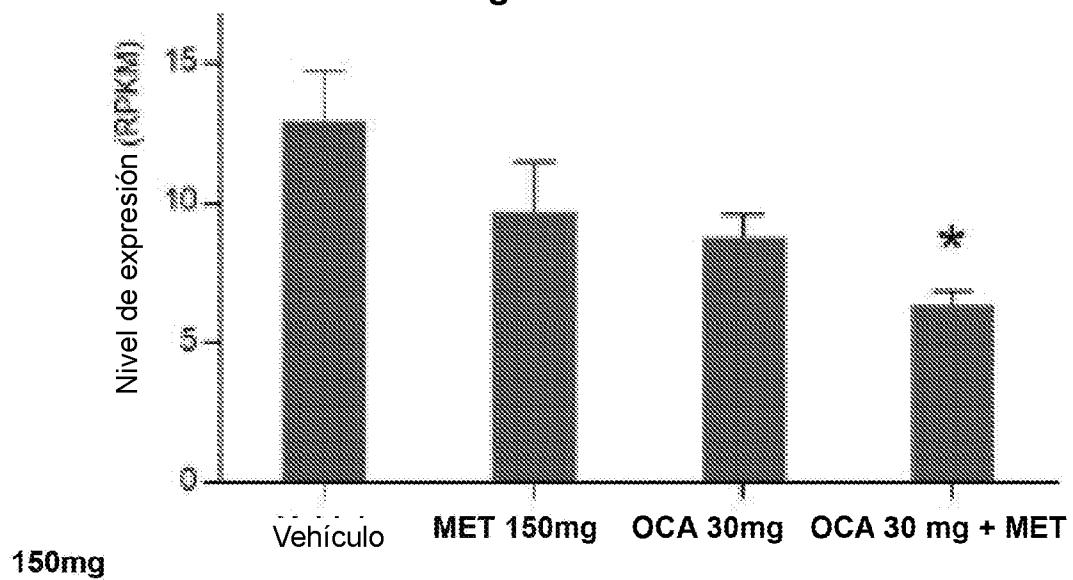
**Figura 14E**



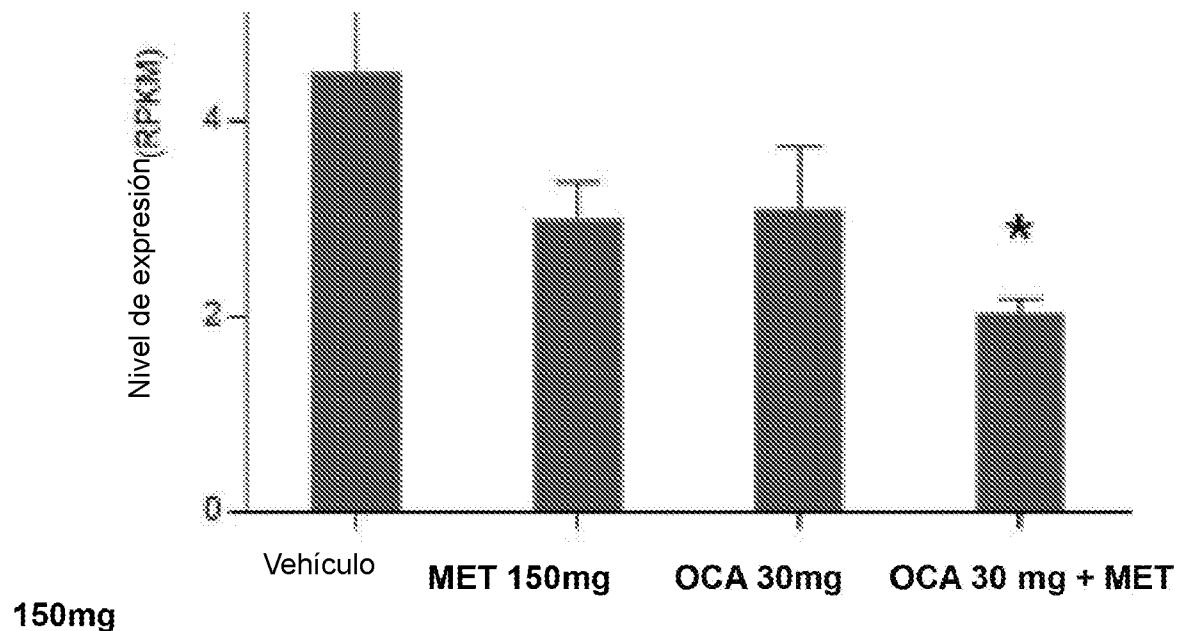
**Figura 14F**



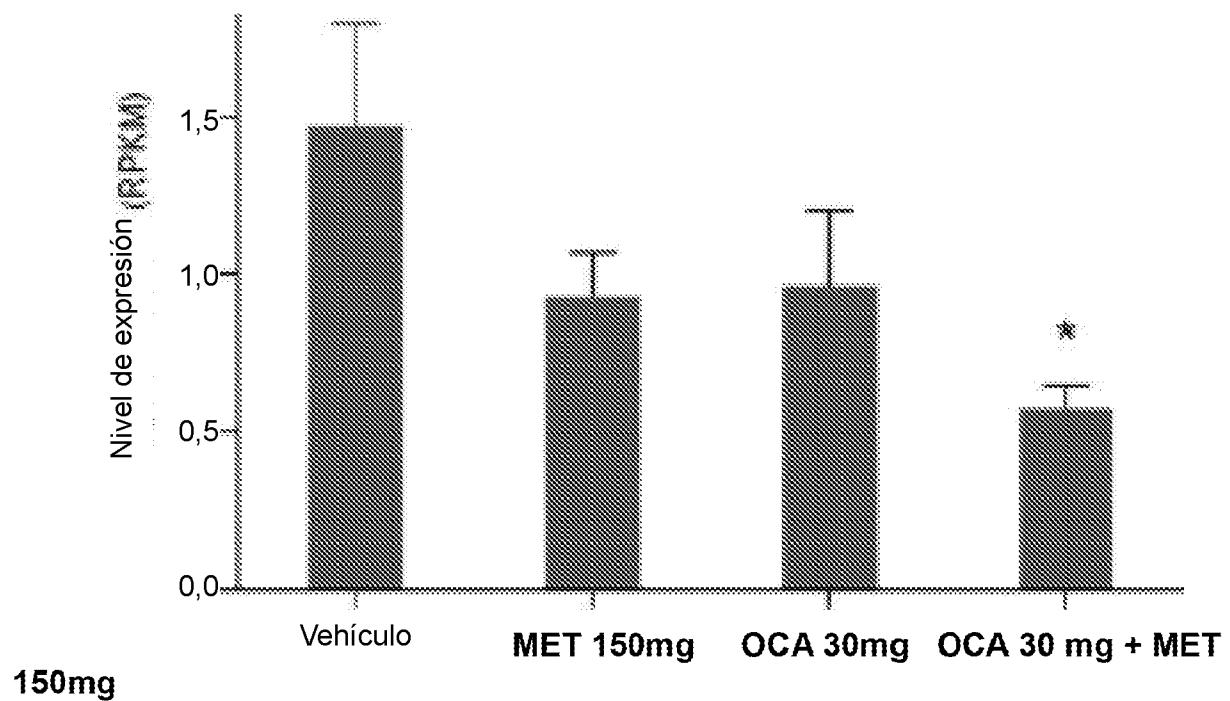
**Figura 15A**



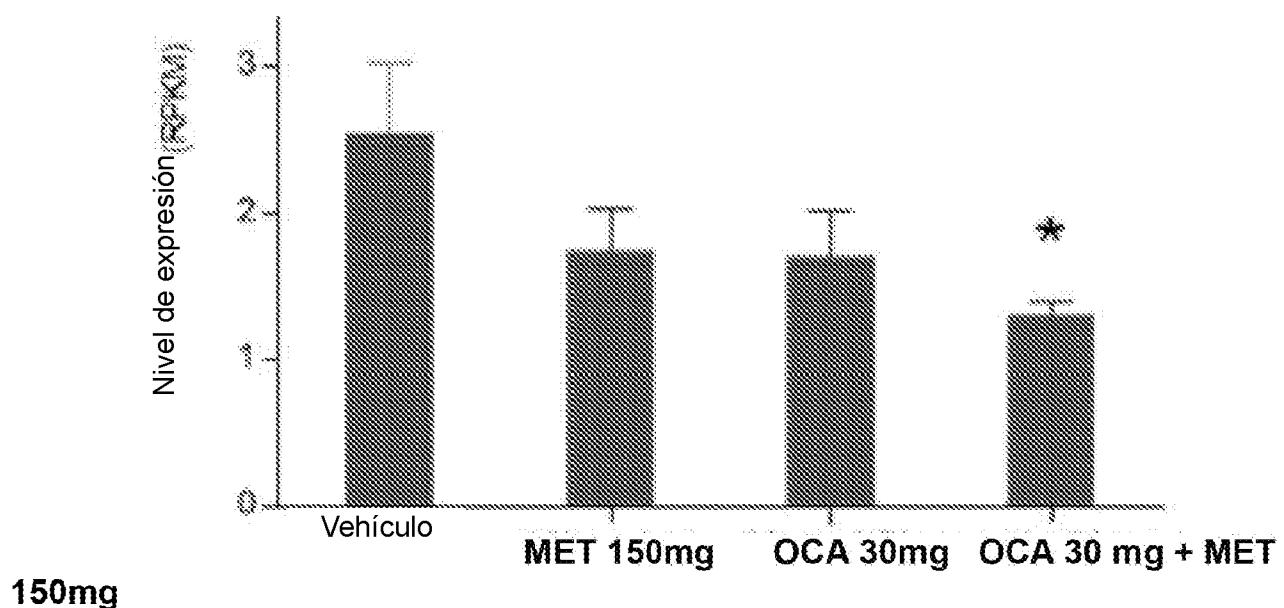
**Figura 15B**



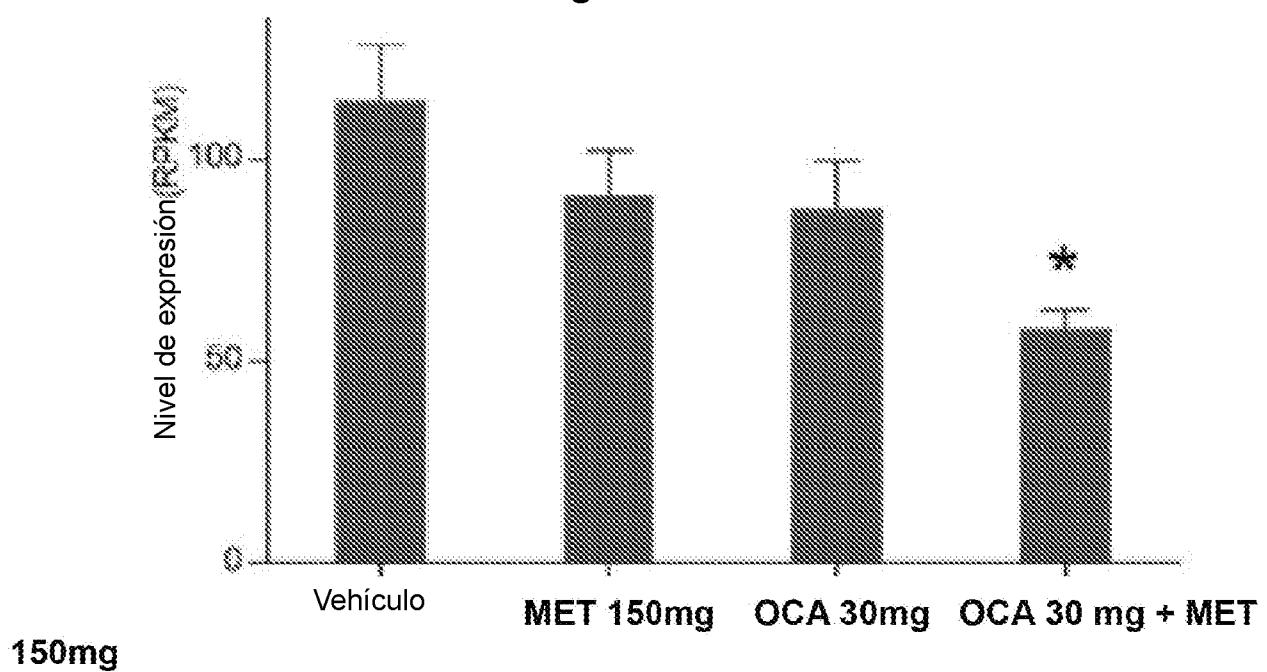
**Figura 15C**



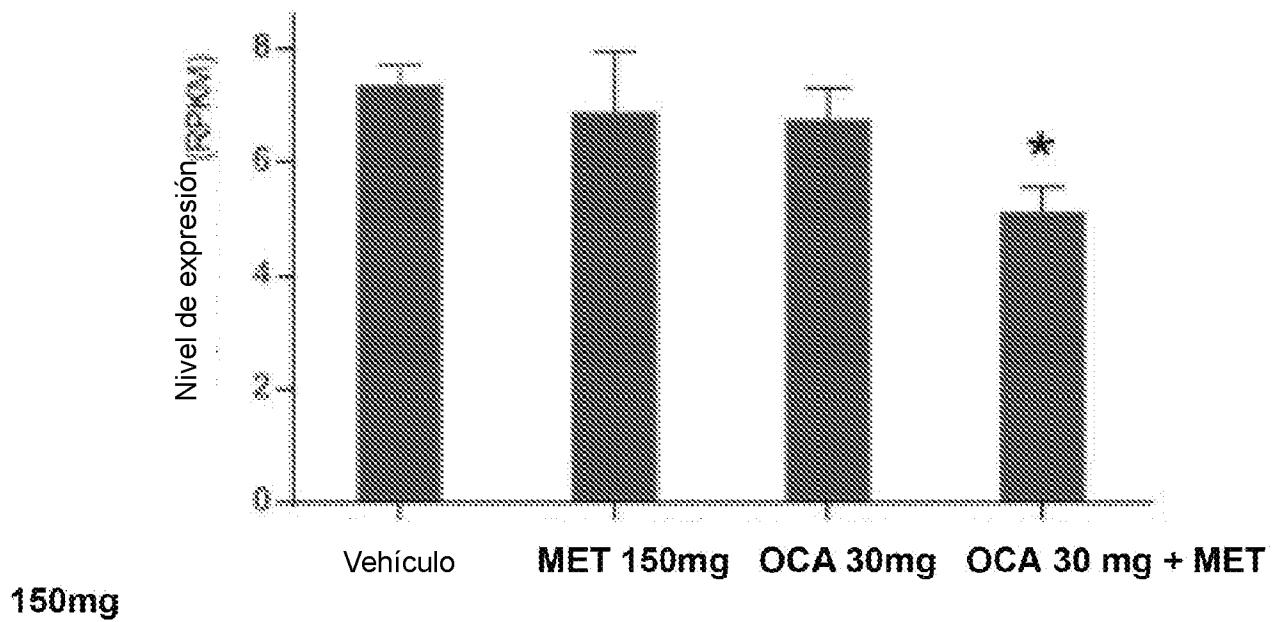
**Figura 16A**



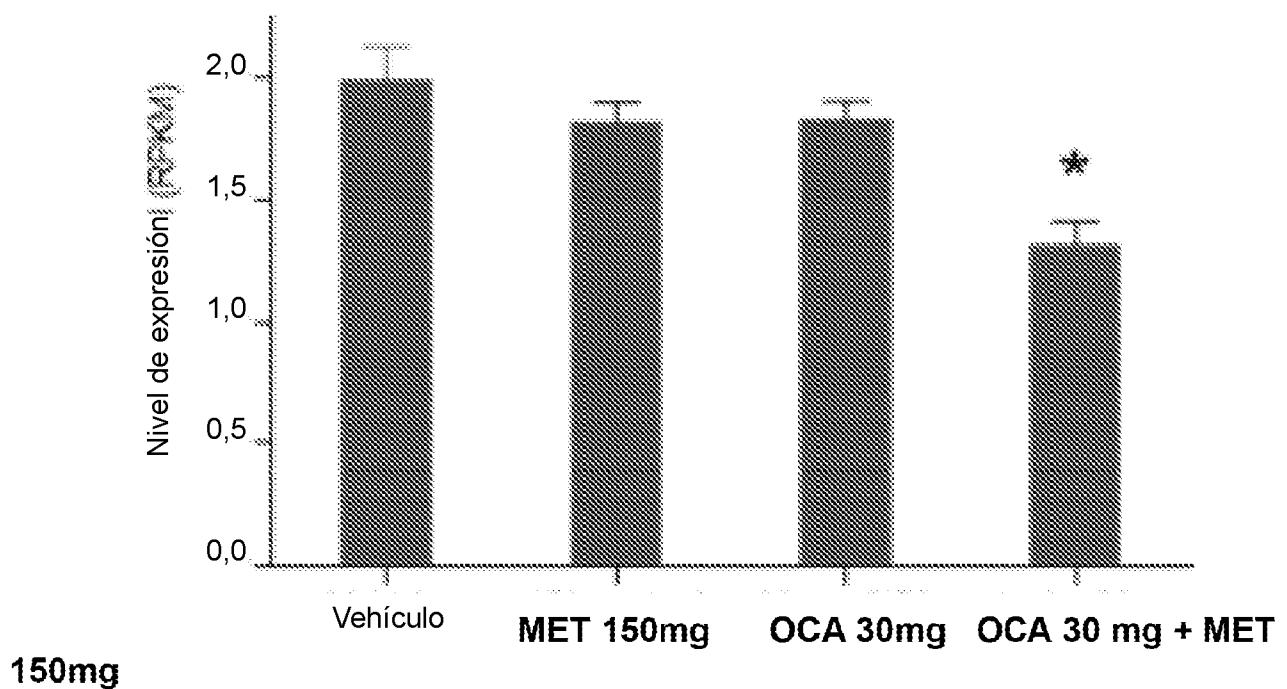
**Figura 16B**



**Figura 16C**



**Figura 16D**



**Figura 16E**

