

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 905 872**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/216** (2006.01)  
**A61K 31/575** (2006.01)  
**C07J 9/00** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2016 PCT/US2016/016694**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16127019**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2016 E 16747312 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3253382**

---

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas para terapia combinada**

(30) Prioridad:

**06.02.2015 US 201562113134 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.04.2022**

(73) Titular/es:

**INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
10 Hudson Yards, 37th FL  
New York, NY 10001, US

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 905 872 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 combinada

5 Antecedentes de la invención

Las concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, como el colesterol y los triglicéridos, acompañan a una serie de condiciones. Estos incluyen diabetes tipo II, cirrosis biliar primaria (PBC por sus siglas en inglés), colangitis esclerosante primaria (PSC por sus siglas en inglés), varios estados de hepatitis crónica (hepatitis B y C), NASH (esteatohepatitis no alcohólica por sus siglas en inglés) y enfermedades arteriales que incluyen enfermedad arterial coronaria, enfermedad arterial cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, aneurismas aórticos y condiciones ateroscleróticas carotídeas. Varias técnicas de reducción de lípidos se han utilizado en el pasado para tratar y prevenir los eventos vasculares (como insuficiencia cardíaca, embolia, ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares) que acompañan a los estados hiperlipidémicos. Dichos tratamientos han incluido cambios en la dieta y el control de los niveles altos de triglicéridos y colesterol que circulan en la sangre. Estos últimos han sido tratados generalmente farmacológicamente y últimamente con diversas "estatinas". Incluidos en los agentes terapéuticos usados para el tratamiento de condiciones para niveles elevados de lípidos están varios derivados del ácido fíbrico. Algunos derivados del ácido fíbrico más antiguos, incluido el clofibrato, han tenido un lugar pasajero en el tratamiento de afecciones asociadas con lípidos elevados, pero más recientemente nuevos fibratos que incluyen fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato e incluso más recientemente fibratos que contienen piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperidin-3-eno y piperazina se han sumado a las filas de las terapias antilipídicas. Estas moléculas más nuevas tienen propiedades prometedoras para reducir tanto el colesterol como los triglicéridos. Sin embargo, en algunas situaciones, un derivado del ácido fíbrico solo es inadecuado para controlar el nivel severo de hiperlipidemia que está presente en muchos pacientes. El perfil de efectos secundarios de un derivado del ácido fíbrico también se puede mejorar con una reducción de la dosis, como en presencia de una terapia de combinación.

Por consiguiente, existe la necesidad de una terapia mejorada para el tratamiento de afecciones que impliquen concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, tales como colesterol y triglicéridos.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con rojo Sirius de ratones BDL simulados.

35 La figura 1B es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con rojo Sirius de ratones tratados con vehículo BDL.

La figura 1C es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con rojo Sirius de ratones tratados con BDL-OCA.

40 La Figura 1D es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con rojo Sirius de ratones tratados con BDL-atorvastatina.

45 La Figura 1E es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con rojo Sirius de ratones tratados con BDL-OCA-atorvastatina.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el área positiva de rojo Sirius (%) en ratones BDL tratados con OCA y atorvastatina solos y en combinación.

50 La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra el número de focos de células inflamatorias del tratamiento de OCA, fenofibrato de dosis baja solo y en combinación en ratones APOE\*3Leiden.CETP.

La figura 3B es un gráfico de barras que muestra el número de focos de células inflamatorias del tratamiento de OCA, fenofibrato de dosis alta solo y en combinación en ratones APOE\*3Leiden.CETP.

55 La figura 4 es un gráfico de barras que muestra los efectos de OCA y atorvastatina solos y en combinación sobre el estadio de fibrosis en ratones ob/ob con leptina.

60 La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra los niveles de triglicéridos en plasma en ratones ob/ob con leptina tratados con OCA y atorvastatina solos y en combinación.

La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra el cambio en los niveles de triglicéridos en plasma desde el valor inicial en ratones ob/ob con leptina tratados con OCA y atorvastatina solos y en combinación.

65 La figura 6A es un gráfico de barras que muestra un análisis de enriquecimiento de las vías canónicas de HFC+OCA frente a ratones APOE\*3Leiden.CETP sostenidos por HFC.

La figura 6B es un gráfico de barras que muestra un análisis de enriquecimiento de las vías canónicas de HFC+OCA+Fenofibrato de dosis baja contra ratones APOE\*3Leiden.CETP sostenidos por HFC.

5 La Figura 7A es un diagrama de Venn que muestra el número de nuevos genes expresados diferencialmente regulados por la combinación de OCA + fenofibrato en dosis baja versus monoterapia en Ratones APOE\*3Leiden.CETP.

La figura 7B es un gráfico de barras que muestra la vía de enriquecimiento de genes regulada por la combinación de OCA + fenofibrato en dosis bajas de frente a la monoterapia en Ratones APOE\*3Leiden.CETP.

10 10 La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de OCA y una combinación de una(s) estatina(s) sobre el colesterol LDL en humanos.

15 Breve descripción de la invención

15 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, y (iii) opcionalmente uno o vehículos más farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

20 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un fibrato y, opcionalmente, (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

25 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un agente reductor de lípidos y, opcionalmente, (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

30 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos una estatina y, opcionalmente, (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

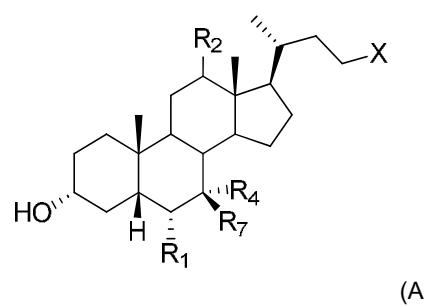
35 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un Agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, (iii) al menos un agente reductor de lípidos, y opcionalmente (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

40 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un fibrato, (iii) al menos un agente reductor de lípidos y, opcionalmente, (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

45 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un Agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, (iii) al menos una estatina y, opcionalmente, (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

50 La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) al menos un fibrato, (iii) al menos una estatina y, opcionalmente, (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

55 En una realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A:

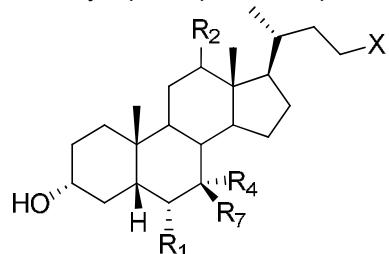


- o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácidos del mismo, donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, y X son como se definen aquí.
- 5 La presente descripción también se refiere a métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por FXR o una enfermedad o afección donde están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, reduciendo el nivel de una enzima hepática o inhibiendo o revertiendo la fibrosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un farmacéutico composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.
- 10 La presente descripción también se refiere al uso de un farmacéutico composición de la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad o condición mediada por FXR o una enfermedad o condición donde están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, reduciendo el nivel de una enzima hepática, o inhibiendo o revertiendo la fibrosis.
- 15 La presente descripción también se refiere al uso de una composición farmacéutica de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o condición mediada por FXR o una enfermedad o condición donde están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, reduciendo el nivel de una enzima hepática, o inhibiendo o revertir la fibrosis.
- 20 Las composiciones y métodos de la presente invención abordan necesidades no satisfechas en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno donde están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, tales como colesterol y triglicéridos.
- 25 Descripción detallada de la invención
- 30 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente solicitud está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, y opcionalmente uno o más vehículos aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR.
- 35 En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-alfa. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista dual de PPAR-alfa y gamma. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-alfa y al menos un agonista de PPAR-delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-alfa y al menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-delta y al menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos un agonista de PPAR-alfa, al menos un agonista de PPAR-delta y al menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta. En un ejemplo, el agonista de PPAR-alfa es un fibrato, como los fibratos descritos en el presente documento. En un ejemplo, el agonista de PPAR-delta es ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil]sulfanil]-2-metilfenoxi} acético (también conocido como GW501516, GW1516 y "Endurabol"), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-il]metilsulfanil}-fenoxi- acético, ácido o [4-[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metilfenoxi- acético, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En un ejemplo, el agonista dual PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2 - metilpropanoico (también conocido como GFT505). En un ejemplo, el agonista dual PPAR-alfa y gamma es aleglitazar (ácido (2S)-2-metoxi-3-[4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)etoxi]-7-benzotiofenilo] propanoico), muraglitazar (N-[4-(4-metoxifenoxy)carbonil]-N-{4-[2-(5-metil-2-fenil-1,3-oxazol-4-il)etoxi]bencil}glicina), tesaglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico) o saroglitazar ((2S)-2-etoxi-3-[4-(ácido 2-[2-metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol-1-il]etoxi)fenil]propanoico), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En un ejemplo, el agonista dual PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2 - metilpropanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 45 La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos un fibrato y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR. El agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR. El fibrato puede ser cualquier fibrato. En un ejemplo, el fibrato se selecciona de cualquiera de los fibratos descritos en el presente documento.
- 50 La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos uno agente reductor de lípidos y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR. El agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR. El agente reductor de lípidos puede ser cualquiera agente reductor de lípidos. En un ejemplo, el agente reductor de lípidos se selecciona de cualquier agente reductor de lípidos descrito en este documento.
- 55 La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos una estatina y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un

agonista de FXR. El agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR. La estatina puede ser cualquier estatina. En un ejemplo, la estatina se selecciona de cualquiera de las estatinas descritas en este documento.

La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos 5 un Agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, al menos uno agente reductor de lípidos y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR. La presente solicitud también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, al menos uno Agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, al menos una estatina y, opcionalmente, uno o más vehículos 10 farmacéuticamente aceptables, donde el primer compuesto es un agonista de FXR. En un ejemplo, el agonista de PPAR-alfa es un fibrato, como los fibratos descritos en el presente documento. En un ejemplo, el agonista de PPAR-delta es ácido {4-[{4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il}metil}sulfanil]-2-metilfenoxi} acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-il]metilsulfanil}-fenoxi}-acético, o ácido [4 -[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metilfenoxi]-acético, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En un ejemplo, el 15 agonista dual PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2 -metilpropanoico. En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y gamma es aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar o saroglitazar, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, el agonista dual PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2 -metilpropanoico, o una sal farmacéuticamente 20 aceptable del mismo. En un ejemplo, el agente reductor de lípidos se selecciona de cualquier agente reductor de lípidos descrito en este documento. En un ejemplo, la estatina se selecciona de cualquiera de las estatinas descritas en este documento.

En un ejemplo, el primer compuesto de la composición farmacéutica es un compuesto de fórmula A:



(A),

25 o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, donde:

R<sub>1</sub> es hidrógeno o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo no sustituido;

R<sub>2</sub> es hidrógeno o  $\alpha$ -hidroxilo;

30 X es C(O)OH, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub>H, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H o OSO<sub>3</sub>H;

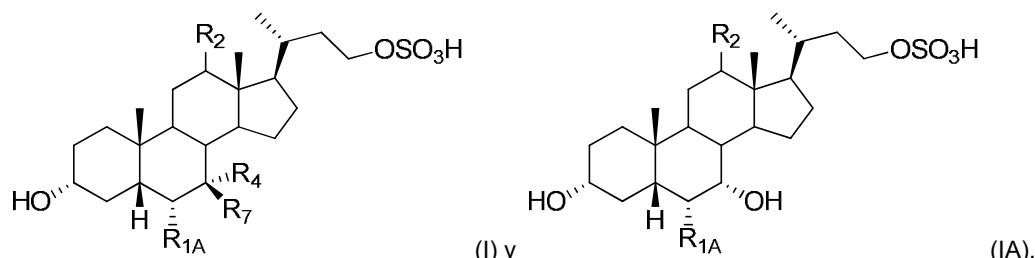
R<sub>4</sub> es hidroxilo o hidrógeno;

R<sub>7</sub> es hidroxilo o hidrógeno;

m es 1, 2 o 3; y

n es 1, 2 o 3.

35 En otro ejemplo, el primer compuesto de la composición farmacéutica se selecciona de las fórmulas I y IA:



40 o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, donde

R<sub>1A</sub> es hidrógeno o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo no sustituido;

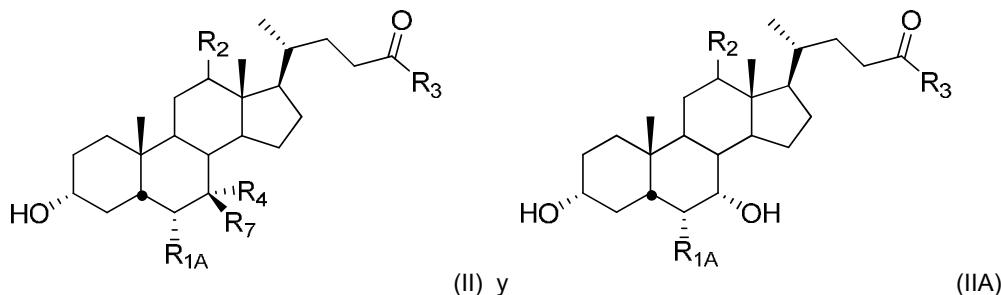
R<sub>2</sub> es hidrógeno o  $\alpha$ -hidroxilo;

R<sub>4</sub> es hidroxilo o hidrógeno; y

45 R<sub>7</sub> es hidroxilo o hidrógeno.

En un aspecto, el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, el primer compuesto es una sal de sodio de fórmula I o IA. En otra realización, el primer compuesto es una sal de amonio de un compuesto de fórmula I o IA. En otra realización, el primer compuesto es una sal de trietilamonio de un compuesto de fórmula I o IA.

- 5 En otro ejemplo más, el primer compuesto de la composición farmacéutica se selecciona de las fórmulas II y IIA:



o un conjugado de sal o aminoácido farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

- 10 R<sub>1A</sub> es hidrógeno o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo no sustituido;  
 R<sub>2</sub> es hidrógeno o  $\alpha$ -hidroxilo;  
 R<sub>3</sub> es hidroxilo, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub>H, o NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H;  
 R<sub>4</sub> es hidroxilo o hidrógeno;  
 15 R<sub>7</sub> es hidroxilo o hidrógeno;  
 m es 1, 2 o 3; y  
 n es 1, 2 o 3.

En un ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, donde R<sub>2</sub> es hidrógeno.

- 20 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde R<sub>1</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo sin sustituir. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde R<sub>1</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alquilo sin sustituir. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde R<sub>1</sub> se selecciona de metilo, etilo y propilo. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde R<sub>1</sub> es etilo.

- 25 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula I, IA, II o IIA, donde R<sub>1A</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo sin sustituir. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula I, IA, II o IIA, donde R<sub>1A</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alquilo sin sustituir. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula I, IA, II o IIA, donde R<sub>1A</sub> se selecciona de metilo, etilo y propilo. En un aspecto, la composición incluye una primera compuesto de fórmula I, IA, II o IIA, donde R<sub>1A</sub> es etilo.

- 30 En otro ejemplo, la composición incluye una primera compuesto de fórmula A, donde X se selecciona de C(O)OH, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub>H y C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde X se selecciona de C(O)OH, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)SO<sub>3</sub>H, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.  
 35 En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde X es C(O)OH. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde X es OSO<sub>3</sub>H. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier sal. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde X es OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde X es OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>NHEt<sub>3</sub><sup>+</sup>. En un aspecto, el conjugado de aminoácidos es un conjugado de glicina. En un aspecto, el conjugado de aminoácidos es un conjugado de taurina.

- 40 En otro ejemplo más, la composición incluye una primera compuesto de fórmula II o IIA, donde R<sub>3</sub> se selecciona de OH, NH(CH<sub>2</sub>)SO<sub>3</sub>H, NH(CH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H y NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H. En un aspecto, la composición incluye una primera compuesto de fórmula II o IIA, donde R<sub>3</sub> es OH.

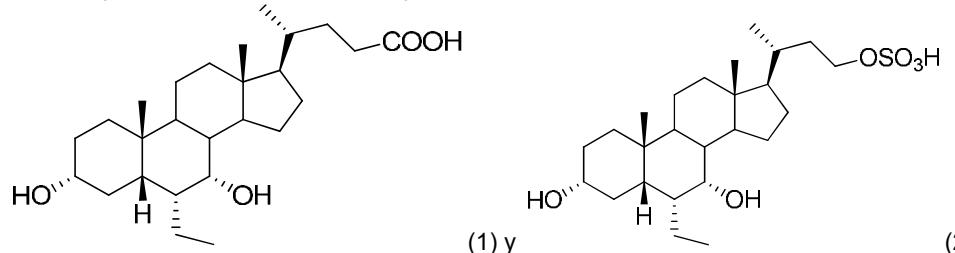
45 En otro ejemplo, la composición incluye una primera compuesto de fórmula A, I o II, donde R<sub>4</sub> es hidroxilo y R<sub>7</sub> es hidrógeno.

- 50 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula A, donde R<sub>1</sub> se selecciona de metilo, etilo y propilo, R<sub>4</sub> es OH, R<sub>7</sub> es H, y R<sub>2</sub> es H.

55 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula I o II, donde R<sub>1A</sub> se selecciona de metilo, etilo y propilo, R<sub>4</sub> es OH, R<sub>7</sub> es H, y R<sub>2</sub> es H.

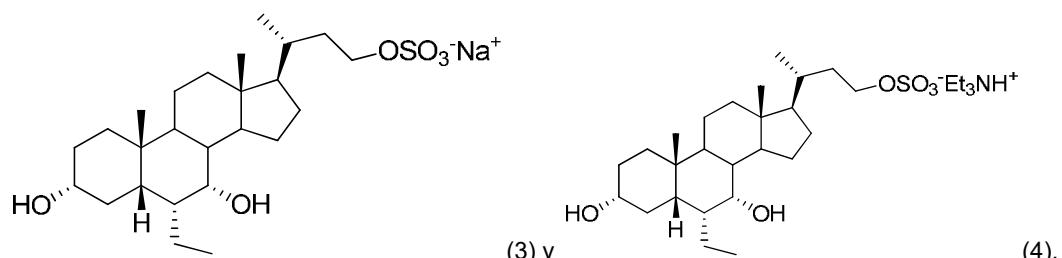
En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de fórmula IA o IIA, donde R<sub>1A</sub> se selecciona de metilo, etilo y propilo, y R<sub>2</sub> es H.

En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto seleccionado de



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

10 En otro ejemplo más, la composición incluye un primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable seleccionada de



15 Los compuestos de fórmulas I, IA, II y IIA son subconjuntos de los compuestos de fórmula A. Las características descritas aquí para los compuestos de fórmula A se aplican igualmente a los compuestos de fórmulas I, IA, II y IIA. La presente solicitud también describe las composiciones farmacéuticas, paquetes o kits y usos terapéuticos de la combinación.

20 Uno de los problemas a resolver por la presente invención es la identificación de terapias combinadas para el tratamiento o prevención de afecciones relacionadas con concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, como el colesterol y los triglicéridos *por ejemplo*, una afección colestásica del hígado como la cirrosis biliar primaria, así como para la reducción de compuestos lipídicos circulantes (*por ejemplo*, colesterol, LDL y triglicéridos) en la sangre, y para la reducción de bilirrubina y/o enzimas hepáticas, como fosfatasa alcalina (ALP, AP o Alk Phos), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y 5' nucleotidasa. Aunque hay disponibles medicamentos para afecciones relacionadas con niveles elevados de lípidos y/o niveles de enzimas hepáticas, estos medicamentos a menudo no son adecuados para muchos pacientes por una variedad de razones. Por ejemplo, ciertos medicamentos son ineficaces para los pacientes que han desarrollado resistencia a los medicamentos, *por ejemplo*, ácido ursodesoxicólico. Como otro ejemplo, muchas estatinas tienen efectos adversos como problemas musculares, pérdida cognitiva, neuropatía, disfunción pancreática y hepática y disfunción sexual. Algunos medicamentos pueden ser inadecuados para el tratamiento cuando se administran solos. Por ejemplo, en algunas situaciones, un agente reductor de lípidos solo es inadecuado para controlar el nivel grave de hiperlipidemia que está presente en muchos pacientes. Algunos medicamentos pueden requerir la administración de dosis altas, o una administración más frecuente, debido al extenso metabolismo en metabolitos inactivos o menos potentes. Las terapias combinadas descritas en este documento pueden resolver los problemas mencionados anteriormente y pueden tener una o más ventajas de, *por ejemplo*, sinergismo, reduciendo el número de dosis diarias sin que el fármaco pierda eficacia, reducir los lípidos (tanto colesterol como triglicéridos) en pacientes cuyos niveles elevados de lípidos son resistentes a la terapia en PBC, potencia, selectividad, penetración tisular, semivida y/o estabilidad metabólica mejoradas.

25

30

35

40 En las composiciones, paquetes o kits, métodos y usos de la presente invención, el primer compuesto puede ser el ácido libre o puede ser un conjugado de sal y aminoácido farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, conjugado de glicina o taurina). Según la invención, el primer compuesto es cualquier agonista de FXR y es ácido obeticólico (Compuesto 1).

45 En las composiciones, paquetes o kits, métodos y usos de la presente invención, el fibrato puede ser cualquier fibrato. En un aspecto, el fibrato se selecciona del grupo que consiste en fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, etofibrato, gemfibrozilo, nicofibrato, pirlifibrato, ronifibrato, simfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrida, y una de sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables, y derivados del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico donde el resto fenoxi está sustituido con un resto opcionalmente sustituido de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno o piperazina, como divulgada en la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. EP0607536. En un aspecto, el fibrato se selecciona del grupo que consiste en bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato,

fenofibrato, gemfibrozil, binifibrato, clinofibrato, ácido clofíbrico, nicofibrato, pirifibrato, plafibrida, ronifibrato, teofibrato, tocofibrato y una sal y un éster farmacéuticamente aceptables de los mismos, y derivados del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico, donde el resto fenoxy está sustituido con un resto opcionalmente sustituido de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno o piperazina, como se describe en la publicación de solicitud de patente europea No. 5 EP0607536. Un ejemplo del último grupo de sustancias es el ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil)piperidin-4-il]fenoxi-2-metilpropanoico. Por ejemplo, el fibrato es bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico o una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, el fibrato es fenofibrato o una sal farmacéuticamente aceptable seleccionada de colina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, calcio y trometamina. Por ejemplo, el fibrato es clofibrato o una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, como etofibrato o clofibrato de aluminio. Por 10 ejemplo, el fibrato es bezafibrato. Por ejemplo, el fibrato es un derivado del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico tal como el ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil)-piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

En una realización, el primer compuesto es el ácido libre de un compuesto de fórmula A, y el al menos un fibrato se 15 selecciona de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato y una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

En una realización, el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula A, y el al menos un fibrato se selecciona de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato y una de sus sales o ésteres farmacéuticamente 20 aceptables.

En una realización, el primer compuesto es el conjugado de glicina de un compuesto de fórmula A, y el al menos un fibrato se selecciona de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato y una de sus sales o ésteres farmacéuticamente 25 aceptables.

En una realización, el primer compuesto es el conjugado de taurina de un compuesto de fórmula A, y el al menos un fibrato se selecciona de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato y sus sales o ésteres farmacéuticamente 30 aceptables.

En una realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula (1) como se muestra en las reivindicaciones o una 35 sal o conjugado de aminoácido farmacéuticamente aceptable, y el al menos un fibrato es ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil) -piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

En una realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable o un 40 conjugado de aminoácidos, y el al menos un agonista de PPAR-delta es ácido {4-[{4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenoxy]-1,3-tiazol-5-il}metil}sulfanil]-2-metilfenoxi} acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenoxi}- acético, o ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenoxy]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metilfenoxi]-acético, o una sal farmacéuticamente 45 aceptable del mismo.

En una realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable o un 40 conjugado de aminoácidos, y el al menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta es Ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenoxy]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico. En una realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos, y el al menos un agonista dual de PPAR-alfa y gamma es aleglitazar, muraglitazar, tesagliptazar o saroglitazar, o un agonista dual farmacéuticamente 45 aceptable del mismo. En un ejemplo, el agonista dual PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenoxy]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En las composiciones, paquetes o kits, métodos y usos de la presente invención, la estatina puede ser cualquier estatina. En un aspecto, la estatina se selecciona del grupo que consiste en simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, 50 mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

En una realización, el primer compuesto es el ácido libre de un compuesto de fórmula A, y la al menos una estatina se 55 selecciona de simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

En una realización, el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula A, y la al menos una estatina se selecciona de simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y 60 compactina.

En una realización, el primer compuesto es el conjugado de glicina de un compuesto de fórmula A, y la al menos una estatina se selecciona de simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

En una realización, el primer compuesto es el conjugado de taurina de un compuesto de fórmula A, y la al menos una estatina se selecciona de simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

- 5 La invención también comprende un primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, que tiene una estructura que es idéntica a la del primer compuesto de la presente invención (*por ejemplo*, un compuesto de fórmula (1)) sino por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados 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. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar al primer compuesto o a un 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  $^{18}\text{F}$ .

10 El primer compuesto o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables que contienen los isótopos antes mencionados y/u otros isótopos de otros átomos está dentro del alcance de la presente invención. El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado de aminoácido del mismo, por ejemplo, un primer compuesto donde 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 tritio, 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 como el deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede aportar ciertas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* mayor o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede usarse en algunas circunstancias. El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o un 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 invención, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no isotópicamente marcado. En una realización, el ácido obeticólico o sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables no están marcados isotópicamente.

15 La presente invención también proporciona la composición reivindicada para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un farmacéutico composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

20 30 En una realización, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección mediada por FXR. Los ejemplos de enfermedades o afecciones mediadas por FXR incluyen, entre otras, enfermedades hepáticas (incluidas enfermedades hepáticas colestásicas y no colestásicas) como cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), atresia biliar, hipertensión portal, bilis, diarrea ácida, enfermedad hepática crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva y fibrosis hepática. Los ejemplos de enfermedades mediadas por FXR también incluyen hiperlipidemia, colesterol LDL alto, colesterol HDL alto, triglicéridos altos y enfermedad cardiovascular.

25 35 40 45 NAFLD es una condición médica que se caracteriza por la acumulación de grasa (llamada infiltración grasa) en el hígado. NAFLD es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y abarca un espectro de condiciones asociadas con el depósito de lípidos en los hepatocitos. Abarca desde la esteatosis (hígado graso simple), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la fibrosis avanzada y la cirrosis. La enfermedad es en su mayoría silenciosa y, a menudo, se descubre a través de niveles elevados de enzimas hepáticas. NAFLD está fuertemente asociado con la obesidad y la resistencia a la insulina y actualmente muchos lo consideran el componente hepático del síndrome metabólico.

50 55 La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una afección que causa inflamación y acumulación de grasa y tejido fibroso (cicatricial) 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 (NAFL). Aunque pueden ocurrir condiciones similares en personas que abusan del alcohol, NASH ocurre en aquellas que beben poco o nada de alcohol. 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 condiciones: obesidad, diabetes, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, uso de ciertos medicamentos y exposición a toxinas. NASH es una causa cada vez más común de enfermedad hepática crónica en todo el mundo y se asocia con una mayor mortalidad relacionada con el hígado y el carcinoma hepatocelular, incluso en ausencia de cirrosis. NASH progresó a cirrosis en 15 a 20% de los individuos afectados y ahora es una de las principales indicaciones para trasplante de hígado en los Estados Unidos. En la actualidad no hay terapias aprobadas para NASH.

60 65 En una realización, la enfermedad o condición es hiperlipidemia. En una realización, la enfermedad o afección es una enfermedad hepática colestásica. En una realización, la enfermedad o condición es PBC. En otra realización, la enfermedad o afección es una enfermedad cardiovascular. En otra realización, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia.

La presente invención también proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir NAFLD o NASH. En una realización, la presente invención proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir NAFLD o NASH que está asociado con hiperlipidemia. En una realización, la presente

invención proporciona la composición reivindicada para su uso en un método para tratar o prevenir NASH. En una realización, la presente invención proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir NASH que está asociado con hiperlipidemia.

- 5 La presente invención también proporciona la composición reivindicada para su uso en un método para inhibir o revertir la fibrosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un farmacéutico composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite. En una realización, el sujeto no sufre de un estado colestásico. En otra realización, el sujeto sufre una condición colestática.
- 10 En una realización, el sujeto no sufre una afección colestásica asociada con una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer biliar y hepático primario (incluido el carcinoma hepatocelular), cáncer colorrectal, cáncer metastásico, sepsis, nutrición parenteral total crónica, cáncer quístico fibrosis y enfermedad granulomatosa del hígado. En realizaciones, la fibrosis que se va a inhibir o revertir ocurre en un órgano donde se expresa FXR.
- 15 En una realización, una afección colestásica se define como tener un nivel sérico anormalmente elevado de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) y/o 5' nucleotidasa. En otra realización, una afección colestásica se define además como la presentación de al menos un síntoma clínico. En una realización, el síntoma es picor (prurito). En otra realización, se selecciona una afección colestásica del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PBS), colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria, atresia biliar y colestasis intrahepática del embarazo.
- 20

En una realización, la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal y fibrosis intestinal.

- 25 En una realización, el sujeto 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 posteriores al trasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD por sus siglas en inglés); enfermedad del hígado graso no alcohólico (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 por almacenamiento de glucógeno 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.
- 30

- 35 En otra realización, 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.

En otra realización, 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 La presente invención también proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir todas las formas de afecciones relacionadas con niveles elevados de lípidos. En una realización, la condición es hiperlipidemia cuando está asociada con una condición seleccionada de cirrosis biliar primaria resistente; cirrosis biliar primaria donde se asocia elevación de las pruebas de función hepática e hiperlipidemia, colangitis esclerosante primaria, esteatohepatitis no alcohólica; y enfermedad hepática crónica asociada con hepatitis B, C o alcohol. En otra realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir la hiperlipidemia donde la hiperlipidemia es hiperlipidemia primaria con o sin un componente genético, o hiperlipidemia asociada con enfermedad arterial coronaria, enfermedad arterial cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, aneurismas aórticos o aterosclerosis carotídea.
- 45

- 50 En un aspecto, la presente invención proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir la colangitis esclerosante primaria por anomalías bioquímicas similares, así como hepatitis crónica causada por hepatitis B, C o por alcohol. En un aspecto, la presente invención proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir otros trastornos arteriales asociados con la hiperlipidemia. En un aspecto, la presente invención proporciona la composición reivindicada para usar en un método para tratar o prevenir la hipertrigliceridemia.
- 55

- La presente invención también proporciona la composición reivindicada para su uso en un método para reducir los niveles de lípidos (es decir, cantidad de lípidos), como en la sangre, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un farmacéutico composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de lípidos en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en comparación con un control. sujeto (*por ejemplo*, un sujeto al que no se le administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene niveles elevados de lípidos, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, el método de la presente solicitud reduce los niveles de lípidos a niveles normales (*por ejemplo*, similar a los niveles de lípidos en un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento).
- 65

- En una realización, el lípido es colesterol. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol en al menos un 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene niveles elevados de colesterol, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol por debajo de 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 una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L o 150 mg/L.
- 5 En una realización, el colesterol es LDL. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL en al menos un 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene niveles elevados de LDL, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, 50 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L o 50 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L o 50 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 70 mg/L, 60 mg/L o 50 mg/L.
- 10 En una realización, el lípido es un triglicérido. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos en al menos un 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene niveles elevados de triglicéridos, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L.
- 15 25 En una realización, el lípido es un triglicérido. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos en al menos un 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene niveles elevados de triglicéridos, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L. En una realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L o 100 mg/L.
- 20 30 35 La presente invención también proporciona la composición reivindicada para su uso en un método para reducir la cantidad de bilirrubina y/o una o más enzimas hepáticas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un farmacéutico composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.
- 40 En una realización, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de bilirrubina por 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, el sujeto tiene un nivel elevado de bilirrubina, en comparación con un sujeto sano (*por ejemplo*, un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento). En una realización, 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 condición, como las descritas en este documento). En otra realización, 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 una realización 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.
- 45 50 En una realización, 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 una realización, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de una o más enzimas hepáticas por 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 administró la composición de la presente invención). En una realización, 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 condición, como las descritas en este documento). En una realización, 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*, similar a los niveles de enzimas hepáticas en un individuo sin una enfermedad o condición, como las descritas en este documento).
- 55 60 En una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALP desde alrededor de 40 IU/L hasta alrededor de 150 IU/L.

En una realización 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALT desde alrededor de 5 IU/L hasta alrededor de 50 IU/L.

- 5 En una realización 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de AST desde aproximadamente 10 UI/L hasta aproximadamente 50 UI/L.  
 10 En una realización 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de GGT desde aproximadamente 15 UI/L hasta aproximadamente 50 UI/L o desde aproximadamente 5 UI/L hasta aproximadamente 30 UI/L.

15 En una realización 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de LDH desde aproximadamente 120 UI/L hasta aproximadamente 220 UI/L.

20 En una realización 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 una realización adicional, el método de la presente solicitud reduce el nivel de 5' nucleotidasa desde aproximadamente 2 UI/L hasta aproximadamente 15 UI/L.

25 En una realización, los métodos de la presente divulgación comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con al menos un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta y/o Agonista dual de PPAR-alfa y delta, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con al menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, donde el primer compuesto es un compuesto descrito en este documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4) o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables.

30 35 En un aspecto, los métodos de la presente descripción comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con al menos un fibrato y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con al menos un fibrato, donde el primer compuesto es un compuesto descrito en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4) o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables.

40 45 En un aspecto, los métodos de la presente descripción comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con al menos una estatina y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con al menos una estatina, donde el primer compuesto es un compuesto descrito en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4) o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables.

50 55 En un aspecto, los métodos de la presente invención comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con al menos un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta y/o Agonista dual de PPAR-alfa y delta, al menos una estatina y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con al menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, al menos una estatina, donde el primer compuesto es un compuesto descrito en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4) o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables.

60 65 En un aspecto, los métodos de la presente divulgación comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con al menos un fibrato, al menos una estatina y, opcionalmente, uno o más transportistas aceptables. En otro aspecto, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con al menos un fibrato, al menos una estatina, donde el primer compuesto es un compuesto descrito en el presente documento (por ejemplo, un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4) o una de sus sales o conjugados de aminoácidos farmacéuticamente aceptables.

En una realización, el sujeto es un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano.

65 En un aspecto, el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, fibrato(s) o estatina(s) se administran en una combinación bidireccional, es

- 5 *dejar, sin ningún agente terapéutico que no sea el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, fibrato(s), o estatina(s). En otro aspecto, el primer compuesto y el(los) fibrato(s) se administran en una combinación bidireccional, es decir, sin ningún otro agente terapéutico que no sea el primer compuesto y fibrato(s). En otro aspecto, el primer compuesto y la(s) estatina(s) se administran en una combinación bidireccional, es decir, sin ningún otro agente terapéutico que no sea el primer compuesto y la(s) estatina(s).*
- 10 En otro aspecto, el primer compuesto y el(los) agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se administran en una combinación de tres vías con una estatina. En otro aspecto, el primer compuesto y los fibratos se administran en una combinación de tres vías con una estatina.
- 15 10 El primer compuesto, junto con agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s), y/o estatina(s) pueden lograr profundos efectos sinérgicos, tales como reducciones sinérgicas en estados hiperlipidémicos combinados severos y aquellos resistentes a terapias individuales y en los niveles de una o más enzimas hepáticas. Por lo tanto, para las hiperlipidemias muy difíciles de controlar, una combinación del primer compuesto, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o un fibrato, y/ o una estatina es ventajosa. Puede ser particularmente ventajoso que dicha combinación del primer compuesto, un fibrato y/o una estatina se proporcione en una sola composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable (como en forma de una sola cápsula) diseñado para aumentar el cumplimiento y, por lo tanto, eficacia. Por consiguiente, la divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del primer compuesto, una cantidad eficaz de al menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, y una cantidad eficaz de al menos una estatina, junto con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, la descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del primer compuesto, una cantidad eficaz de al menos un fibrato y una cantidad eficaz de al menos una estatina, junto con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes o excipientes.
- 20 15 En un aspecto, el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se administran simultáneamente. Por ejemplo, el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se administran juntos en una composición farmacéutica única con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se administran secuencialmente. Por ejemplo, el primer compuesto se administra antes o después de agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s).
- 25 20 En un aspecto, el primer compuesto y la estatina se administran simultáneamente. Por ejemplo, el primer compuesto y la estatina se administran juntos en una única composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, el primer compuesto y la estatina se administran secuencialmente. Por ejemplo, el primer compuesto se administra antes o después de la estatina.
- 30 25 En una realización, el primer compuesto se administra en una primera dosis durante un primer período de tiempo, seguido de la administración del primer compuesto en una segunda dosis durante un segundo período de tiempo. En una realización, se administra un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo 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 por primera vez, seguido de la administración del primer compuesto 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 una realización, la cantidad total se administra por vía oral una vez al día. En una realización, la primera dosis es diferente de la segunda dosis. En otra realización, la primera dosis es más baja que la segunda dosis. En otra realización, la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En una realización, la primera dosis es de aproximadamente 5 mg (*por ejemplo, de 4,8 mg a 5,2 mg*), y la segunda dosis es de unos 10 mg (*por ejemplo, de 9,8 mg a 10,2 mg*). En una realización, el primer período de tiempo es de aproximadamente 6 meses. En una realización, el segundo período de tiempo es de aproximadamente 6 meses.
- 35 30 En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral, parenteral o tópica. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral.
- 40 35 Una composición de acuerdo con la presente descripción contendrá típicamente suficiente primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa, y agonista(s) gamma dual(es), o fibrato(s), y/o estatina(s) para permitir que la dosis diaria deseada de cada uno se administre a un sujeto que lo necesite en una sola forma de dosificación unitaria, como una tableta o cápsula, o en dos o más formas de dosificación unitaria para administrarse simultáneamente o a intervalos durante un día.
- 45 40 60 45 La divulgación también proporciona una composición farmacéutica donde el primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se

5 administran en combinación con UDCA. En un aspecto, UDCA se administra en una combinación de tres vías. En otro aspecto, la combinación bidireccional de un primer compuesto y agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) s) se administra para el tratamiento o prevención de una enfermedad o condición, en lugar de UDCA a un sujeto que tiene una respuesta terapéutica inadecuada a UDCA solo.

10 En los métodos de la presente invención, 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. Habitualmente, los principios activos se administrarán simultáneamente, más habitualmente en una única forma de dosificación combinada.

15 En un aspecto, el primer compuesto, agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s), y/o la(s) estatina(s) se administra(n) a dosis sustancialmente iguales a las dosis a las que se administran en las respectivas monoterapias. En un aspecto, el primer compuesto se administra a una dosis que es inferior a (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) su dosis de monoterapia. En un aspecto, el(los) 20 agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) se administran a una dosificación que es menos que (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) su dosis de monoterapia. En un aspecto, tanto el primer compuesto como los agonistas de PPAR-alfa, los agonistas de PPAR-delta, los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o los fibratos se administran en una dosis inferior a (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) de su respectiva monoterapia dosis. En un aspecto, la(s) estatina(s) se 25 administra(n) en una dosis que es inferior a (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) su dosis de monoterapia. En un aspecto, tanto el primer compuesto como la(s) estatina(s) se administran en una dosis que es inferior a (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) de su respectiva monoterapia dosis. En un aspecto, el primer compuesto, agonista(s) 30 de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s), y/o las estatinas se administran a una dosis inferior a (*por ejemplo*, menos del 90%, menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%) de su respectiva monoterapia dosis.

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

40 Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes, edulcorantes, agentes desintegrandes, diluyentes, agentes aromatizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes de retardo de tiempo farmacéuticamente aceptables. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma de 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, 45 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, 50 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 retardadores de tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

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

60 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, hidroxipropilmetylcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o alcohol cetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, polioxietilenos ésteres de ácidos grasos tales como ácido esteárico, mono- o dioleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitol, mono- o dioleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitol y similares.

65

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

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención 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 reductor de lípidos, por ejemplo, fibrato, y opcionalmente la(s) estatina(s) junto con el(los) excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) seleccionado(s). Un tipo de composición farmacéutica de la presente invención en forma de tableta o cápsula se puede preparar (a) preparando una primera tableta que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo y al menos un agente reductor de lípidos junto con cualquier excipiente(s), vehículo(s), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) preparar un segundo comprimido o una cápsula, donde el segundo comprimido o la cápsula incluye el(los) principio(s) activo(s) restante(s) y el primer comprimido. Otro tipo de composición farmacéutica de la presente invención en forma de cápsula se puede preparar (a) preparando una primera cápsula que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas del primer compuesto o una de sus sales o aminoácidos farmacéuticamente aceptables y el(los) agente(s) reductor(es) de lípidos, junto con cualquier excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) preparar una segunda cápsula, donde la segunda cápsula incluye el resto principio(s) activo(s) y la primera cápsula. Se puede preparar otro tipo de composición farmacéutica de la presente invención en forma de tableta (a) preparando una cápsula que comprende al menos una de las sustancias activas seleccionadas de un primer compuesto o una de sus sales o aminoácidos farmacéuticamente aceptables y al menos un agente reductor de lípidos, junto con cualquier excipiente(s), portador(es), adyuvante(s) y/o diluyente(s) deseado(s), y (b) preparar un comprimido, donde el comprimido incluye el principio activo restante(s) y la cápsula.

10

15

20

25 De acuerdo con la divulgación, el(los) agonista(s) de PPAR-alfa, el(los) agonista(s) de PPAR-delta, el(los) agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s), y/o estatina(s) se usa como tableta de liberación inmediata o como tableta de liberación sostenida. Es particularmente efectivo cuando se proporciona en una tableta de liberación sostenida. Las tabletas de liberación sostenida de varios agentes reductores de lípidos están disponibles comercialmente. Es preferible para una acción prolongada que la tableta esté en un formato de liberación sostenida.

30

35 En otro aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende una cápsula que contiene agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) y/o estatina(s) dentro de una cápsula que contiene un primer compuesto o una de sus sales o aminoácidos farmacéuticamente aceptables. Típicamente, en esta forma, el(los) agonista(s) de PPAR-alfa, agonista(s) de PPAR-delta, agonista(s) dual(es) de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato(s) y/o estatina(s) se presenta en forma de publicación inmediata. En ese caso, es habitual administrar la composición tres veces al día. Otro modo de administración es proporcionar una composición que contiene los agonistas de PPAR-alfa, los agonistas de PPAR-delta, los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibratos, y/o estatina(s) en una forma de liberación sostenida o no sostenida como se describe anteriormente, dos veces al día, donde la cantidad diaria de la composición administrada contiene una cantidad suficiente de las sustancias activas para proporcionar la dosis diaria deseada al paciente.

40

45 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son una forma de dosificación que comprende un primer compuesto o una de sus sales o aminoácidos farmacéuticamente aceptables en una cantidad total diaria de 0,1 a 1500 mg, 0,2 a 1200 mg, 0,3 a 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 una realización, la cantidad total se administra por vía oral una vez al día.

50

55 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de la divulgación son una forma de dosificación que comprende un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato y/o estatina en una cantidad total diaria de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg o 100-300 mg, más típicamente alrededor de 200 mg. En una realización, la cantidad total se administra por vía oral una vez al día. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de la invención son una forma de dosificación que comprende una estatina en una cantidad de 5-1000 mg, 10-800 mg, 20-500 mg, 30-400 mg o 40-200 mg.

60

65 De acuerdo con la divulgación, las composiciones de la invención son una forma de dosificación que comprende un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato, y/o estatina en un cantidad de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg o 100-300 mg, más típicamente alrededor de 200 mg, contenida dentro de una cápsula que contiene el primer compuesto en una cantidad 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 aspecto, el agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato y/o estatina está en forma de liberación sostenida.

70

75 En realizaciones, las composiciones de la invención son una forma de dosificación que comprende una tableta de liberación sostenida de bezafibrato, en una cantidad de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg o 100-300 mg , más típicamente alrededor de 200 mg, contenido dentro de una cápsula que contiene el primer compuesto en una cantidad 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. De esta forma, el paciente al que se administra la forma de dosificación

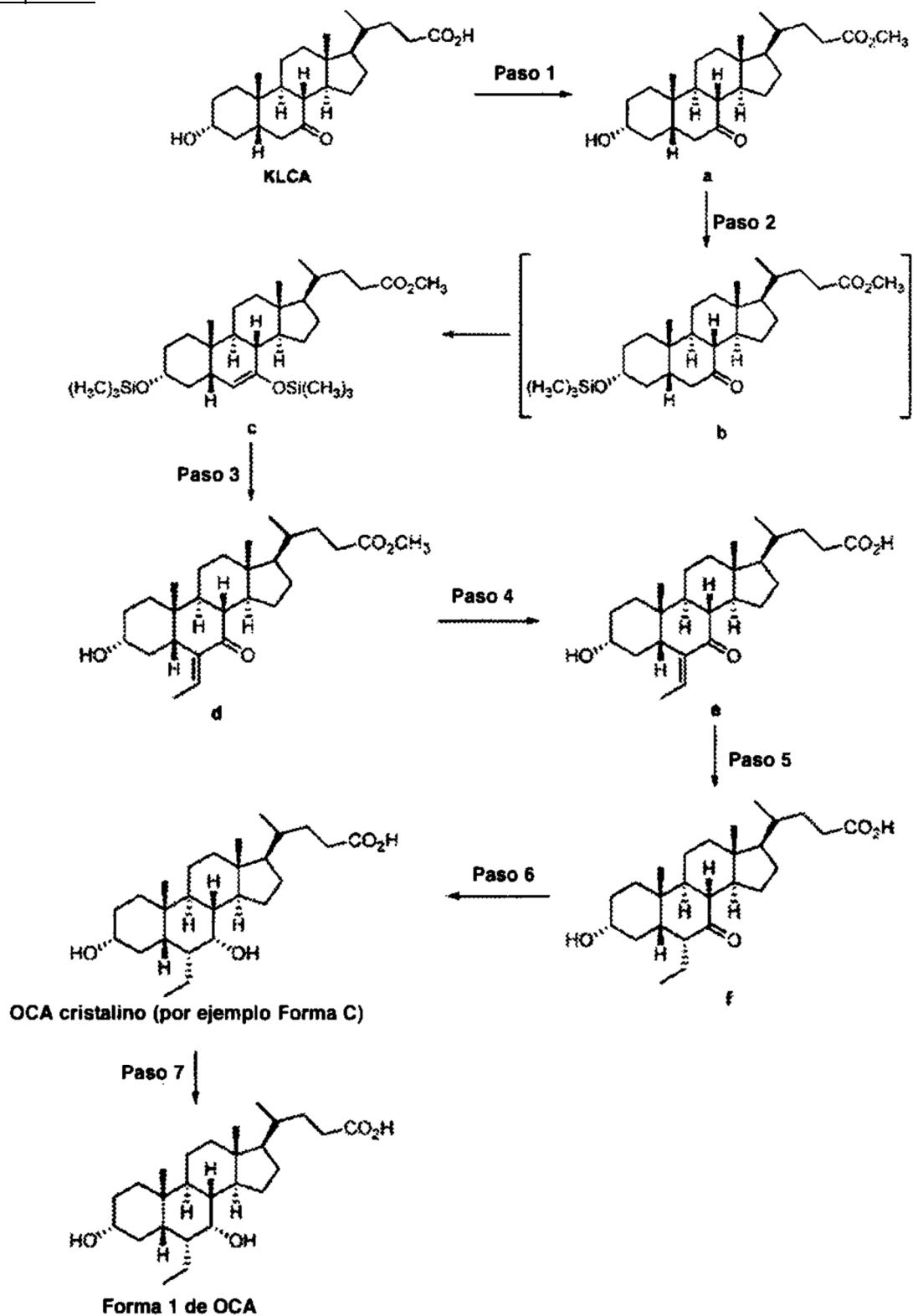
recibe una tableta de liberación sostenida de bezafibrato que se administra en el antro distal cuando la cápsula se rompe y libera el primer compuesto.

5 La composición farmacéutica de la presente invención puede ser utilizada de por vida por el paciente, prolongando la supervivencia y retrasando el trasplante hepático. La reducción de la hiperlipidemia y de las enzimas hepáticas asegura la reducción del desarrollo de la enfermedad vascular asociada. Ambos el primer compuesto y los agentes hipolipemiantes, como los fibratos y/o las estatinas, tienen un perfil de efectos secundarios a largo plazo muy mínimo (con algunas excepciones para el bezafibrato) y, por lo tanto, es probable que esta combinación sea la terapia de elección para la cirrosis biliar primaria (PBC) con hiperlipidemia y para la cirrosis biliar primaria resistente (PBC). Debido a la dosificación 10 simplificada proporcionada por la presente invención, una terapia combinada de la presente invención se puede usar en dosis crecientes, dependiendo del peso y la respuesta clínica del paciente.

15 Una composición de la presente divulgación que comprende un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato, y/o se puede proporcionar una estatina como las tres sustancias activas dentro de una sola cápsula. En una forma de dicha composición, una estatina se puede mezclar con un primer compuesto en una cápsula interna, la cápsula interna está rodeada por un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, agonista dual o fibrato contenido dentro de una cápsula exterior. Las ubicaciones dentro de las cápsulas pueden invertirse. Es decir, la mezcla de una estatina y un primer compuesto puede 20 estar contenida dentro de la cápsula externa y el agonista de PPAR-alfa, el agonista de PPAR-delta, el agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el fibrato pueden estar contenidos dentro de la cápsula interna. Esta disposición será especialmente deseable si la cantidad de estatina a administrar es relativamente grande. Son posibles otras combinaciones para la administración de la combinación de tres sustancias activas.

25 Los primeros compuestos descritos en este documento se pueden preparar mediante los métodos convencionales (*por ejemplo*, los descritos en la publicación de EE. UU. No. 2009/0062526, la patente de EE. UU. No. 7,138,390 y WO 2006/122977) como se muestra en el Esquema 1 a continuación.

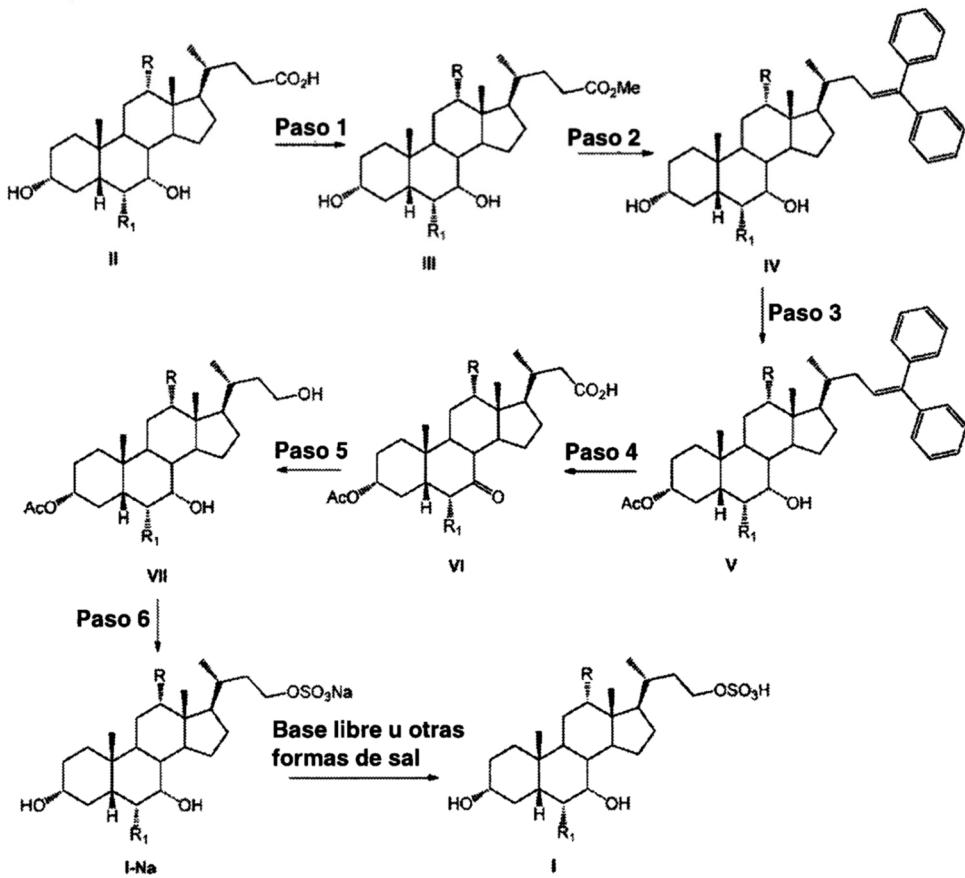
Esquema 1



El proceso anterior se describió en WO2013/192097. El proceso es una síntesis de 6 pasos seguida de un paso de purificación. El paso 1 es la esterificación del ácido carboxílico C-24 del ácido 7-cetolitocólico (KLCA) para producir el compuesto de éster metílico a. El paso 2 es la formación de éter de sililenol a partir del compuesto 1 para producir el compuesto c. El paso 3 es una reacción de condensación aldólica del compuesto éter de sililenol c y acetaldehído para producir el compuesto d. El paso 4 es la saponificación del compuesto d para producir el compuesto e. El paso 5 es la hidrogenación del compuesto e para producir el compuesto f. El Paso 6 es la reducción selectiva del grupo 7-ceto del

compuesto f para producir el Compuesto 1 cristalino. El Paso 7 es la conversión del compuesto cristalino al Compuesto 1 amorfó (ácido obeticólico Forma 1 u OCA Forma 1).

Alternativamente, el primer compuesto descrito en este documento se puede preparar mediante los métodos convencionales (*por ejemplo*, los descritos en la patente de EE. UU. No. 7,932,244), o mediante un proceso como se muestra en el Esquema 2 (y divulgado en el documento WO 2014/066819). El Esquema 2 puede usarse para preparar el Compuesto 2, 3 o 4 descrito en este documento.



El paso 1 es la esterificación de un compuesto de fórmula II para obtener un compuesto de fórmula III. El paso 2 es una reacción para formar un compuesto de fórmula IV a partir de un compuesto de fórmula III. El paso 3 es la protección del grupo hidroxilo en la posición C3 de un compuesto de fórmula IV para dar un compuesto de fórmula V. El paso 4 es la escisión oxidativa del compuesto de fórmula V para dar un compuesto de fórmula VI. El paso 5 es la reducción de un compuesto de fórmula VI para dar un compuesto de fórmula VII. El paso 6 es la sulfonación de un compuesto de fórmula VII para dar una sal de fórmula I-Na. Una sal de fórmula I-Na se puede convertir a su forma de base libre (*es decir*, un compuesto de fórmula I) u otras formas de sal (*por ejemplo*, una sal de fórmula I-(Et)<sub>3</sub>NH).

#### Definiciones

Por conveniencia, aquí se recopilan ciertos términos utilizados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fibrato" significa cualquiera de los derivados del ácido fibrílico y derivados farmacéuticamente activos del ácido 2-fenoxy-2-metilpropanoico útiles en los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de fibratos incluyen, pero no se limitan a, fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofibrílico, etofibrato, gemfibrozilo, nicosíbrato, pírifibrato, ronifibrato, simfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrílico, etc. También se describen ejemplos de fibratos en las patentes de EE.UU. números 3,781,328, 3,948,973, 3,869,477, 3,716,583, 3,723,580, 3,723,446, 4,058,552, 3,674,836, 3,369,836, 3,984,412, 3,984,413, 3,971,413, 3,971,413, 3,971,798, 6,384,062, 7,119,198 y 7,259,186; EE.UU. Pub. No. 20090131395; WO2008/039829; Patente belga no. 884722; Patente del Reino Unido no. 860303; y publicación de solicitud de patente europea núm. EP0607536, cuyas descripciones completas se incorporan aquí como referencia.

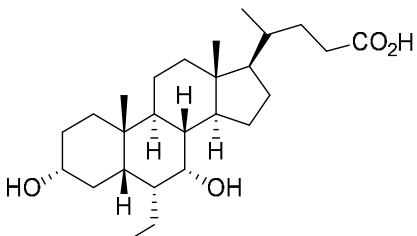
El receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR-alfa), también conocido como NR1C1 (subfamilia de receptores nucleares 1, grupo C, miembro 1), es una proteína receptora nuclear. Un agonista de PPAR-alfa se une a PPAR-alfa y lo activa. Los ejemplos de un agonista de PPAR-alfa incluyen, pero no se limitan a, un fibrato, como los fibratos descritos en el presente documento.

5 El receptor delta activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-delta), también conocido como NR1C2 (subfamilia de receptores nucleares 1, grupo C, miembro 2), es una proteína receptora nuclear. Un agonista de PPAR-delta se une a PPAR-delta y lo activa. Los ejemplos de un agonista de PPAR-delta incluyen, entre otros, ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil]sulfanil]-2-metilfenoxi}acético (también conocido en la técnica como GW501516, GW1516 y Endurabol), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenoxi}- acético y ácido [4-[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio] -2-metilfenoxi]- acético.

10 Un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma se une y activa tanto PPAR-alfa como PPAR-delta, o tanto PPAR-alfa como PPAR-gamma. Los ejemplos de agonista dual PPAR-alfa y delta incluyen, entre otros, Ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico (también conocido como GFT505). Los 15 ejemplos de agonistas duales de PPAR alfa y gamma incluyen, entre otros, aleglitazar ácido ((2S)-2-metoxi-3-[4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)etoxi]-7 -benzotiofenil]propanoico, CAS No. 475479-34-6), muraglitazar (N-[4-(4-metoxifenoxy)carbonil]-N-{4-[2-(5-metil-2-fenil-1,3- oxazol-4-il)etoxi]bencil}glicina, CAS No. 331741-94-7), tesaglitazar ácido ((2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico, CAS No. 251565-85-2) y saroglitazar ácido ((2S)-2-etoxi-3-[4-(2-{2-metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol- 1-il}etoxi)fenil]propanoico, CAS No. 495399-09-2).

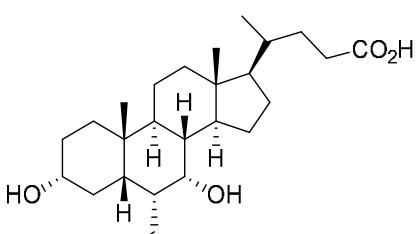
20 Como se usa en el presente documento, el término "agonista de FXR" se refiere a cualquier compuesto que active FXR. En un aspecto, un agonista de FXR logra al menos un 50 % de activación de FXR en relación con CDCA, el control positivo apropiado en los métodos de ensayo descritos en el documento WO 2000/037077. En otro aspecto, un agonista de FXR logra una activación del 100 % 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 25 documentos 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.

Como se usa en este documento, el término "ácido obeticólico" u "OCA" se refiere a un compuesto que tiene la estructura química:



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

Como se usa en este documento, el término "ácido obeticólico cristalino" se refiere a cualquier forma cristalina de un compuesto que tiene la estructura química:



Ácido obeticólico cristalino significa que el compuesto se cristaliza en una disposición de empaquetamiento de cristal 45 específica en tres dimensiones espaciales o el compuesto tiene planos de cara externos. La forma cristalina del ácido obeticólico (o una de sus sales farmacéuticamente aceptables) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaque de cristal, todas las cuales tienen la misma composición elemental de ácido obeticólico. Las diferentes formas de cristal suelen tener diferentes patrones de difracción de rayos X, espectro infrarrojo, puntos de fusión, dureza de densidad, forma de cristal, 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 de cristal. Los cristales de ácido obeticólico se pueden preparar por cristalización en diferentes condiciones, *por ejemplo*, diferentes

disolventes, temperaturas, etc. Los ejemplos de formas cristalinas de OCA se describen en la Patente de EE.UU. No. 9,238,673.

- 5 El término "primer compuesto" significa un compuesto de fórmula A, I, IA, II o IIA, o el Compuesto 1, 2, 3 o 4, o una de sus sales o aminoácidos farmacéuticamente aceptables. Siempre que se utilice el término en el contexto de la presente invención, debe entenderse que la referencia se hace a la base libre, un compuesto marcado isotópicamente, un compuesto cristalino o una sal correspondiente farmacéuticamente aceptable o conjugados de aminoácidos del mismo, siempre que sea posible y/o apropiado según las circunstancias.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "conjugados de aminoácidos" se refiere a conjugados de un primer compuesto de la presente invención (*por ejemplo*, un compuesto de Fórmula A) con cualquier aminoácido adecuado. Por ejemplo, dicho conjugado de aminoácidos adecuado de un compuesto de Fórmula A tendrá la ventaja añadida de una mayor integridad en la bilis o los fluidos intestinales. Los aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, glicina y taurina. Por tanto, la presente invención abarca los conjugados de glicina y taurina de un primer compuesto de la presente invención (*por ejemplo*, Compuesto 1).

15 El término "estatina" es sinónimo de los términos "inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa" e "inhibidor de la HMG-CoA reductasa". Estos términos se usan indistintamente en este documento. Como sugieren los sinónimos, las estatinas son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y, como tales, son eficaces para reducir el nivel de colesterol en plasma sanguíneo y, en consecuencia, para tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares. Las estatinas y sus sales farmacéuticamente aceptables son particularmente útiles para reducir los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en mamíferos y particularmente en humanos. Estructuralmente, las estatinas o sus derivados tienen en común un sistema 4-hidroxi-6-oxo-2H-pirano, que también puede estar en forma de dihidroxiácido que interactúa con el sitio activo de la HMG-CoA reductasa, y una parte lipofílica que se presenta en particular como un sistema hexahidronaftalénico polisustituido, pero también puede ser reemplazado por un sistema heteroaromático polisustituido, como en atorvastatina o fluvastatina. Las estatinas adecuadas para su uso en este documento incluyen, entre otras, simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 30 El término "agente reductor de lípidos" se refiere a cualquier agente que sea capaz de reducir la concentración de lípidos (*por ejemplo*, colesterol, LDL y triglicéridos) en circulación (*por ejemplo*, en la sangre). Un agente reductor de lípidos incluye, entre otros, (i) un secuestrante de ácidos biliares, como una resina (*por ejemplo*, colestiramina, colestipol, colesevelam), (ii) un inhibidor de la absorción de colesterol, que impide la absorción de colesterol (*por ejemplo*, del intestino delgado al sistema circulatorio), como ezetimiba (*es decir*, (3R,4S)-1-(4-fluorofenil)-3-[(3S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroxipropil]-4-(4-hidroxifenil)azetidin-2-ona) y (3R,4S)-1,4-bis(4-metoxifenil)-3-(3-fenilpropil)-2-azetidinona, iii) ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3, incluidos los derivados de ácidos grasos libres (*por ejemplo*, Omacor®, Lovaza®, <sup>SE</sup>Vascepa™, Epadel, Epanova™) o ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 de origen marino, (iv) inhibidores de PCSK9, (v) ácido nicotínico, (vi) fitoesteroles (p. ej., esteroles y estanoles vegetales), como β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasisterol, ergosterol, β-sitostanol, campestanol, estigmastanol, cicloartenol y lupeol, (vii) inhibidores de la CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol por sus siglas en inglés), como anacetrapib, Evacetrapib, torcetrapib y Dalcetrapib, (viii) inhibidores de la escualeno sintasa, (ix) oligonucleótidos antisentido que afectan la síntesis, degradación, absorción y metabolismo de los lípidos (*por ejemplo*, oligonucleótidos antisentido que se une al ARNm que codifica la apolipoproteína B o PCSK9) (*por ejemplo*, Mipomersen (Kynamro)), (x) inhibidores de la apoproteína-B, (xi) inhibidores de la proteína transportadora de triglicéridos microsómicos (*por ejemplo*, Lomitapida (Juxtapid)), y (xii) otros compuestos, como colesevelam, avasimiba e implitapida.

35 40 45 50 "Tratar", incluye cualquier efecto, *por ejemplo*, disminuir, reducir, modular o eliminar, que resulte en la mejora de la condición, enfermedad, trastorno, etc. El "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*, provocando la regresión temporal o permanente del estado de enfermedad o de sus síntomas clínicos.

55 "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 todavía no experimenta o muestra síntomas del estado de enfermedad.

60 El término "inhibir" o "inhibición", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier efecto positivo detectable sobre el desarrollo o la progresión de una enfermedad o afección. Dicho efecto positivo puede incluir el retraso o la prevención de la aparición de al menos un síntoma o signo de la enfermedad o afección, el alivio o la reversión de los síntomas o signos, y la ralentización o prevención del empeoramiento de la enfermedad. el(los) síntoma(s) o signo(s).

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

65 El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un primer compuesto (*por ejemplo*, un ligando activador de FXR), o un fibrato, o un agente reductor de

- lípidos, o una estatina que produce un efecto terapéutico agudo o crónico tras la administración de dosis apropiada, solo o en combinación. En una realización, una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer compuesto (*por ejemplo*, un ligando activador de FXR) produce un efecto terapéutico agudo o crónico tras la administración de la dosis apropiada en combinación con al menos un fibrato. El efecto incluye la prevención, corrección, 5 inhibición o reversión de los síntomas, signos y patología subyacente de una enfermedad/afección (*por ejemplo*, fibrosis del hígado, riñón o intestino) y complicaciones relacionadas en cualquier grado detectable. Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" variará dependiendo del primer compuesto, el fibrato, el agente reductor de lípidos, la estatina, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, *etc.*, del sujeto a tratar.
- 10 Se puede formular una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer compuesto junto con uno o más fibratos y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración a un ser humano o un animal no humano. Por consiguiente, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar, *por ejemplo*, por vía oral, parenteral o tópica, para proporcionar una cantidad eficaz del primer compuesto y el o los fibratos. En realizaciones 15 alternativas, las composiciones de la invención se pueden usar para recubrir o impregnar un dispositivo médico, *por ejemplo*, un stent.
- "Efecto farmacológico", tal como se usa en el presente documento, abarca los efectos producidos en el sujeto que logran el propósito previsto de una terapia. En una realización, un efecto farmacológico significa que se previenen, alivian o reducen las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquel que 20 da como resultado la prevención, el alivio o la reducción de indicaciones primarias en un sujeto tratado. En otra realización, un efecto farmacológico significa que se previenen, alivian o reducen los trastornos o síntomas de las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquel que da como resultado la prevención, el alivio o la reducción de los trastornos o síntomas en un sujeto tratado.
- 25 Debe entenderse que los isómeros que surgen de átomos de carbono asimétricos (*por ejemplo*, todos los enantiómeros y diastereómeros) están incluidos dentro del alcance de la invención, a menos que se indique lo contrario. Dichos isómeros se pueden obtener en forma sustancialmente pura mediante técnicas clásicas de separación y mediante síntesis estereoquímicamente controlada.
- 30 Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene agentes terapéuticos tales como un primer compuesto y un agente reductor de lípidos, tal como un fibrato, en una forma adecuada para su administración a un sujeto. En una realización, la composición farmacéutica está a granel o en forma de dosificación unitaria. Puede ser ventajoso formular composiciones en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis 35 unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de reactivo activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas y dependen directamente de las características únicas de los agentes activos y del efecto terapéutico particular que se desea lograr, y de las limitaciones inherentes en el arte de componer dicho agente activo para el tratamiento de individuos
- 40 El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis 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 este documento.
- 45 La forma de dosificación unitaria es cualquiera de una variedad de formas, que incluyen, *por ejemplo*, una cápsula, una bolsa IV, una tableta, una sola bomba en un inhalador de aerosol o un vial. La cantidad del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y varía según el tratamiento particular implicado y/o los agentes reductores de lípidos utilizados para el 50 tratamiento. Un experto en la técnica apreciará que a veces es necesario realizar variaciones de rutina en la dosificación dependiendo de la edad y el estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una variedad de rutas, 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 invención incluyen polvos, aerosoles, 55 ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. En una realización, el primer compuesto y/o un agente reductor de lípidos se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propelador que se requiera.
- 60 El término "dosis instantánea" se refiere a formulaciones que se dispersan rápidamente en formas de dosificación. El término "liberación inmediata" se define como la liberación de un agente terapéutico (como un primer compuesto o un agente hipolipemianta) de una forma de dosificación en un período de tiempo relativamente breve, generalmente hasta 65 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 desde una forma de dosificación durante un período prolongado.

Un "sujeto" incluye mamíferos, *por ejemplo*, humanos, animales de compañía (*por ejemplo*, perros, gatos, pájaros y similares), animales de granja (*por ejemplo*, vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves y similares), y animales de laboratorio (*por ejemplo*, ratas, ratones, conejillos de Indias, pájaros y similares). En una realización, el sujeto es un ser humano. En un aspecto, el sujeto es femenino. En un aspecto, el sujeto es masculino.

5

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

10

"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 que no es indeseable biológicamente ni de otro modo, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se usa en la especificación y las reivindicaciones incluye tanto uno como más de uno de dichos excipientes.

15

Si bien es posible administrar el primer compuesto directamente sin ninguna formulación, el primer compuesto se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta formulación se puede administrar por una variedad de vías que incluyen oral, bucal, rectal, intranasal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal.

20

En una realización, el primer compuesto se puede administrar por vía transdérmica. Para administrar por vía transdérmica, se necesita un dispositivo de administración transdérmica ("parche"). Dichos parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar una infusión continua o discontinua de un compuesto de la presente invención en cantidades controladas.

25

La construcción y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Patente de EE.UU. No. 5,023,252. Dichos parches pueden construirse para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos.

30

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención está adaptada para administración bucal y/o sublingual o nasal. Esta realización proporciona la administración del primer compuesto de una manera que evita complicaciones gástricas, como el metabolismo de primer paso por el sistema gástrico y/o por el hígado. Esta vía de administración también puede reducir los tiempos de adsorción, proporcionando un inicio más rápido de los beneficios terapéuticos.

35

El primer compuesto puede administrarse en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosis diarias normalmente caen dentro del intervalo de alrededor de 0,0001 a alrededor de 30 mg/kg de peso corporal. En el tratamiento de seres humanos adultos, puede usarse el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg/día, en dosis única o dividida. En una realización, la formulación comprende de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1500 mg de un primer compuesto. En otra realización, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg de un primer compuesto. En otra realización, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg de un primer compuesto. En otra realización, la formulación comprende de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg de un primer compuesto. En otra realización, la formulación comprende de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 26 mg de un primer compuesto. En otra realización, la formulación comprende de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg de un primer compuesto. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del primer compuesto realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, incluida la afección a tratar, la vía de administración elegida, la forma del primer compuesto administrado, los agentes reductores de lípidos 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 invención de ninguna manera. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del rango mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial, siempre que dichas dosis mayores se dividan primero en varias dosis más pequeñas para su administración durante todo el día.

45

"Fibrosis" se refiere a una condición que involucra el desarrollo de tejido conectivo fibroso excesivo, *por ejemplo*, tejido cicatricial, en un tejido u órgano. Tal 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, incluidos el hígado, los riñones, los intestinos, los pulmones, el corazón, etc.

50

Como se usa en el presente documento, una "afección colestásica" se refiere a cualquier enfermedad o afección donde se altera o bloquea la excreción de bilis del hígado, lo que puede ocurrir en el hígado o en los conductos biliares. La colestasis intrahepática y la colestasis extrahepática son los dos tipos de afecciones colestásicas. La colestasis intrahepática (que se produce dentro del hígado) se observa con mayor frecuencia en cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, sepsis (infección generalizada), hepatitis alcohólica aguda, toxicidad por fármacos, nutrición parenteral total (alimentación por vía intravenosa), malignidad, fibrosis quística, atresia y embarazo. La colestasis extrahepática (que ocurre fuera del hígado) puede ser causada por tumores de las vías biliares, estenosis, quistes,

divertículos, formación de cálculos en el conducto biliar común, pancreatitis, tumor pancreático o seudoquiste y compresión debido a una masa o tumor en un órgano cercano.

5 Los síntomas y signos clínicos de una afección colestática incluyen: picazón (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 una condición colestásica puede ser diagnosticado y seguido clínicamente con base en un conjunto de pruebas de laboratorio clínico estándar, que incluyen la medición de los niveles de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamilo transpeptidasa (GGT), 5' nucleotidasa, bilirrubina, ácidos biliares y colesterol en suero sanguíneo de un paciente. En general, a un paciente se le diagnostica una afección colestásica si los niveles séricos de los tres 10 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, según el protocolo de prueba. Por lo tanto, un médico podrá determinar, según el laboratorio específico y el procedimiento de prueba, qué nivel en sangre anormalmente elevado es para cada uno de los marcadores. Por ejemplo, un paciente que padece un estado colestásico generalmente tiene más de aproximadamente 125 UI/L de fosfatasa alcalina, más de 15 aproximadamente 65 UI/L de GGT y más de aproximadamente 17 NAL de 5' nucleotidasa en la sangre. Debido a la variabilidad en el nivel de los marcadores séricos, se puede diagnosticar una afección colestásica sobre la base de niveles anormales de estos tres marcadores además de al menos uno de los síntomas mencionados anteriormente, como picazón (prurito).

20 El término "cirrosis biliar primaria", a menudo abreviado PBC, es un enfermedad autoinmune del hígado marcada por la destrucción lenta y progresiva de los pequeños conductos biliares del hígado, con los conductos intralobulillares (Canales de Hering) afectados al principio de la enfermedad. Cuando estos conductos están dañados, bilis se acumula en el hígado (colestasis) y con el tiempo daña el tejido. Esto puede provocar cicatrices, fibrosis y cirrosis. La cirrosis biliar primaria se 25 caracteriza por la destrucción de los conductos biliares interlobulillares. Los hallazgos de la cirrosis biliar primaria incluyen: inflamación de los conductos biliares, caracterizada por linfocitos intraepiteliales y granulomas epiteloides periductales. Hay 4 etapas de PBC.

Etapa 1 - Etapa del Portal: Triadas de tamaño normal; inflamación portal, sutil daño en el conducto biliar. A menudo se detectan granulomas en esta etapa.

30 Etapa 2 - Etapa periportal: tríadas ampliadas; periportal fibrosis y/o inflamación. Típicamente esta etapa se caracteriza por el hallazgo de una proliferación de pequeños conductos biliares.

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

35 Etapa 4 - Cirrosis biliar: Nódulos presentes; guirnalda

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 conducir a cirrosis del hígado, insuficiencia hepática y cáncer de hígado.

40 El término "esteatohepatitis no alcohólica" (NASH) es una inflamación del hígado causado por una acumulación de grasa en el hígado. En algunas personas, la acumulación de grasa provoca inflamación del hígado. Debido a la inflamación, el hígado no funciona tan bien como debería. NASH puede empeorar y causar cicatrización del hígado, lo que conduce a cirrosis. NASH es similar al tipo de enfermedad hepática que es causada por el consumo excesivo de alcohol a largo plazo. Pero 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 consta de células y tejidos y 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 estructuras relacionadas que forman los órganos visuales). El término "órgano" abarca además cualquier estructura parcial de células y tejidos diferenciados que sea potencialmente capaz de convertirse en una estructura completa (*por ejemplo*, un lóbulo o una sección de un hígado).

50 55 En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación. Todos los porcentajes y proporciones utilizados en este documento, a menos que se indique lo contrario, son en peso.

## Ejemplos

65 **Ejemplo 1:** Modelo de ligadura de conductos biliares (BDL por sus siglas en inglés)

Este experimento se realizó para evaluar los efectos de OCA y atorvastatina solos y en combinación sobre la fibrosis inducida por la ligadura del conducto biliar común en ratones.

*Animales, alojamiento y dieta.*

5 Se obtuvieron ratones macho C57BL/6 (6 semanas de edad) de Japan SLC. Los animales se mantuvieron en una instalación libre de patógenos específicos en condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $45 \pm 10\%$ ), iluminación (ciclos de luz y oscuridad artificial de 12 horas; luz de 8:00 a 20:00), y renovación de aire (tasa de renovación de aire: más de 40 veces/hora). Se mantuvo una alta presión ( $20 \pm 4 \text{ Pa}$ ) en la sala experimental para evitar la 10 contaminación de la instalación. Los animales se alojaron en KN-600 (Natsume Seisakusho, Japón) con un máximo de 6 ratones por jaula. Se usó Sterilized Paper-Clean (Japan SLC) para la ropa de cama y se reemplazó una vez por semana. Se proporcionó dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés) sólida esterilizada y agua ad libitum durante 3 semanas 15 antes del día de la cirugía.

15 *Grupos de tratamiento*

Grupo 1: Simulación

A los ratones con operación simulada ( $n = 8$ ) se les administró por vía oral vehículo (0,5 % de CMC) en un volumen de 5 20 ml/kg una vez al día desde el día 0 hasta el día 6 después de la cirugía BDL.

Grupo 2: BDL-Vehículo

A los ratones operados con BDL ( $n = 12$ ) se les administró vehículo por vía oral (CMC al 0,5 %) en un volumen de 5 ml/kg 25 una vez al día desde el día 0 hasta el día 6 después de la cirugía BDL.

Grupo 3: BDL-OCA

A los ratones operados con BDL ( $n = 12$ ) se les administró por vía oral vehículo complementado con OCA a una dosis de 30 5 mg/kg una vez al día desde el día 0 hasta el día 6 después de la cirugía BDL.

Grupo 4: BDL-Atorvastatina

A los ratones operados con BDL ( $n = 12$ ) se les administró por vía oral un vehículo complementado con atorvastatina a 35 una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde el día 0 hasta el día 6 después de la cirugía BDL.

Grupo 5: OCA-BDL-Atorvastatina

A los ratones operados con BDL ( $n = 12$ ) se les administró por vía oral vehículo suplementado con OCA en una dosis de 40 5 mg/kg y atorvastatina en una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde el día 0 hasta el día 6 después de la cirugía BDL.

*Cirugía de ligadura de vías biliares*

45 La cirugía de ligadura de la vía biliar se realizó el día 0. La colestasis, que conduce a la fibrosis del hígado con el tiempo, se estableció en los ratones mediante la ligadura del conducto biliar común bajo anestesia con pentobarbital. Los ratones se dividieron en dos cohortes quirúrgicas en función de su peso antes del día de la cirugía. Después de afeitar el cabello, se abrió la cavidad abdominal y se ligó el conducto biliar común dos veces con seda quirúrgica 5-0 y se cortó el conducto biliar común entre las ligaduras. El peritoneo y la piel se cerraron con suturas. Los ratones se transfirieron a una jaula limpia (jaula de descanso) para recuperarse de la anestesia. Los ratones simulados se operaron de manera similar a 50 otros grupos, pero no se ligó el conducto biliar.

*Seguimiento y sacrificio de animales*

55 La viabilidad, los signos clínicos y el comportamiento se monitorearon diariamente. El peso corporal se registró diariamente durante el período de tratamiento. El consumo de alimentos se midió dos veces por semana por jaula durante el período de tratamiento. En el día 6, los animales fueron sacrificados por desangrado mediante punción cardíaca directa bajo anestesia con éter (Wako Pure Chemical Industries).

*Análisis histológico*

60 Para visualizar la deposición de colágeno, las secciones del hígado lateral izquierdo fijadas por Bouin se tiñeron con una solución de rojo picro-Sirius (Waldeck, Alemania). Para el análisis cuantitativo del área de fibrosis, se capturaron imágenes de campo brillante de secciones teñidas con rojo Sirius alrededor de la vena central usando una cámara digital (DFC295; Leica, Alemania) con un aumento de 100 veces, y las áreas positivas en 5 campos/sección se midieron utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, EE. UU.). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism Software 6 (GraphPad Software, Inc. USA).

## Resultados

5 Se realizaron análisis histopatológicos en secciones de hígado (según métodos de rutina) mediante tinción con rojo Sirius para estimar el porcentaje de área de fibrosis. Microfotografías representativas de secciones de hígado teñidas con rojo Sirius se muestran en las Figuras 1A -1E. El grupo BDL-Vehículo mostró un aumento significativo en el área roja positiva de Sirius en comparación con el grupo BDL-Simulación. Como se indica en la Tabla 1 y la Figura 2, el grupo de atorvastatina BDL-OCA mostró una disminución significativa en el área roja positiva de Sirius en comparación con el grupo de BDL-Vehículo.

10

Tabla 1

Parámetro (media ± DE)	Simulado (n=8)	BDL-Vehículo (n=11)	BDL-OCA (n=12)	BDL-ATO (n=12)	BDL-OCA +ATO (n=12)
Área roja positiva de Sirius (%)	1,30 ± 0,45	2,17 ± 0,43	2,06 ± 0,37	2,31 ± 0,63	1,60 ± 0,44 (p<0,05)

Los resultados de la Tabla 1 indican que la combinación de OCA y atorvastatina redujo significativamente la fibrosis.

15

### Ejemplo 2: NASH inducida por dieta en ratones APOE\*3Leiden.CETP

Este experimento se realizó para evaluar los efectos de OCA y fenofibrato, solos o en combinación, sobre el desarrollo de NASH inducido por dieta y fibrosis hepática en ratones transgénicos APOE\*3Leiden.CETP. Se realizaron perfiles de expresión génica hepática y análisis de vías posteriores para determinar si la combinación regula genes novedosos no regulados por ninguno de los tratamientos de monoterapia, y/o regula más fuertemente genes también afectados por la monoterapia.

20

#### Animales, alojamiento y dieta.

25

Se obtuvieron ratones macho transgénicos APOE\*3Leiden.CETP (9-21 semanas de edad) y se alojaron 2-5 ratones por jaula. Los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas que contenía un 24 % de manteca de cerdo y un 1 % (p/p) de colesterol. El período inicial fue de 15 semanas con la dieta rica en grasas. En la semana 16, los ratones se emparejaron según la edad, el peso corporal, el colesterol plasmático y los triglicéridos después de un ayuno de 4 horas.

30

#### Grupos de tratamiento

Grupo 1: Grupo de referencia HFC inicio tratamiento

35

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas durante la corrida en las semanas 0 a 14.

Grupo 2: grupo de control de HFC

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas desde la semana 0 hasta la 24.

40

Grupo 3: HFC+OCA

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas complementada con OCA en una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde la semana 16 a la 24.

45

Grupo 4: Fenofibrato de dosis baja + HFC

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas complementada con fenofibrato a una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde la semana 16 a la 24.

50

Grupo 5: Fenofibrato de alta dosis + HFC

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas complementada con fenofibrato a una dosis de 40 mg/kg una vez al día desde la semana 16 a la 24.

55

Grupo 6: HFC+OCA + Fenofibrato de dosis baja

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas suplementada con OCA en una dosis de 10 mg/kg una vez al día y fenofibrato en una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde la semana 16 a la 24.

60

## 5 Grupo 7: HFC+OCA + Fenofibrato de dosis alta

Los ratones (n=15) fueron alimentados con una dieta rica en grasas suplementada con OCA en una dosis de 10 mg/kg una vez al día y fenofibrato en una dosis de 40 mg/kg una vez al día desde la semana 16 a la 24.

## 10 Grupo 8: grupo de control de pienso

Los ratones (n=8) fueron alimentados con pienso desde la semana 0 hasta la 24.

15 10 *Diseño del estudio*

Los ratones fueron alimentados con pienso alto en grasas (HFC) durante 14 semanas. Después de 15 semanas con la dieta HFC, los ratones HFC se emparejaron en 7 grupos según la edad, el peso corporal, el colesterol plasmático y los triglicéridos después de un ayuno de 4 horas. Los ratones se trataron con OCA y fenofibrato, solos o en combinación, a partir de la semana 15 y se sacrificaron en la semana 25 sin ayunar. Una semana antes del sacrificio, los ratones se marcaron con D<sub>2</sub>O, por inyección i.p. de un bolo de D<sub>2</sub>O y posterior adición de 4% D<sub>2</sub>O al agua potable. El plasma (EDTA) se obtuvo mediante punción cardíaca y se almacenó a -70°C. Se pesó el hígado y se aislaron 4 piezas de hígado: 1 pieza (lóbulo medial) se fijó en formalina al 10 % (para histología de NASH y fibrosis) y 3 piezas (lóbulo siniestro) se congelaron instantáneamente en N líquido<sub>2</sub> y almacenado individualmente a -70°C.

20 20 *Puntuación de inflamación hepática*

La inflamación es una característica clave de NASH. La inflamación se clasificó según el procedimiento de Liang et al., PlosOne 2014 Dic. 9(12) y se calificó analizando cuantitativamente el número de agregados de células inflamatorias. En particular, el nivel de inflamación se evaluó contando el número de focos inflamatorios por campo utilizando un aumento de 100x (tamaño de vista de 3,1 mm<sup>2</sup>; promedio de cinco campos diferentes).

30 *Resultados: Resumen de los efectos de OCA +/- fenofibrato sobre la inflamación en ratones APOE\*3-Leiden.CETP*

35 Los efectos de OCA 10 mg/kg se investigaron solos y en combinación con fenofibrato (10 y 40 mg/kg) sobre la inflamación en ratones APOE\*3-Leiden.CETP con una dieta NASH. Después de 10 semanas de administración del fármaco en dosis bajas, ni OCA (10 mg/kg) ni fenofibrato (10 mg/kg) redujeron el número de focos de células inflamatorias (Figuras 3A y 3B y Tabla 2). Por el contrario, la combinación redujo significativamente la inflamación en relación con el control del vehículo, así como con cada brazo de monoterapia. Una dosis más alta de fenofibrato (40 mg/kg/d) también redujo significativamente la inflamación en relación con los controles del vehículo. Cuando se combinó con OCA, no se observaron efectos antiinflamatorios adicionales, ya que la dosis alta de fenofibrato ejerció un efecto casi máximo por sí sola. En resumen, se observó una reducción significativa de la inflamación con la combinación de fenofibrato en dosis bajas de OCA (-63 %). Además, se observó una reducción significativa con la dosis alta de fenofibrato (-74%) y una reducción similar en combinación con OCA (-79%). Consulte la Tabla 2 y las Figuras 3A y 3B.

40 Tabla 2

Grupo	(# de focos de células inflamatorias)
Grupo 1: grupo de referencia HFC	24,3 ± 17,3
Grupo 2: grupo de control de HFC	27,5 ± 18,0 (n=15)
Grupo 3: OCA	29,1 ± 22,7
Grupo 4: dosis bajas de fenofibrato	22,0 ± 15,6
Grupo 5: dosis altas de fenofibrato	7,1 ± 5,9
Grupo 6: fenofibrato de dosis baja de OCA	10,0 ± 7,0
Grupo 7: fenofibrato de alta dosis de OCA	5,1 ± 7,0
Grupo 8: control de comida	0,8 ± 0,4

45 Los resultados de la Tabla 2 sugieren que la eficacia de la combinación de OCA y la dosis alta de fenofibrato es impulsada y alcanza un límite superior por la dosis alta de fenofibrato.

86 *Aislamiento y secuenciación de ARN*

La extracción de ácido nucleico se realizó como se describió anteriormente en detalle (Verschuren et al., 2014). Brevemente, el ARN total se extrajo de muestras de hígado individuales utilizando perlas de vidrio y RNAzol (Campro Scientific, Veenendaal, Países Bajos). La concentración y la calidad del ARN se determinaron utilizando el Fragment

Analyzer (Advanced Analytical Technologies, EE. UU.) y el kit RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip y un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). Todas las muestras cumplieron con los requisitos de calidad y se utilizaron en el procedimiento de secuenciación de ARN.

5 Se utilizó el kit de preparación de bibliotecas de ARN ultradireccional NEBNext para Illumina para procesar las muestras. La preparación de la muestra se realizó de acuerdo con el protocolo "Kit de preparación de bibliotecas de ARN ultradireccional NEBNext para Illumina" (NEB#E7420S/L). Brevemente, el ARNm se aisló del ARN total utilizando perlas magnéticas oligo-dT. Después de la fragmentación del ARNm, se realizó una síntesis de ADNc. Esto se usó para la ligadura de los adaptadores de secuenciación y la amplificación por PCR del producto resultante. La calidad y el rendimiento después de la preparación de la muestra se midió con el Analizador de Fragmentos (Advanced Analytical Technologies, EE. UU.). El tamaño de los productos resultantes fue consistente con la distribución de tamaños esperada (un pico amplio entre 300-500 pb).

10 15 La agrupación y la secuenciación del ADN con Illumina NextSeq 2500 se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los datos se generaron usando un protocolo de secuenciación de lectura de un solo extremo obteniendo aprox. 15 millones de lecturas por muestra y 75 pb por lectura. El análisis de imágenes, la llamada de base y la verificación de calidad se realizaron con la canalización de análisis de datos de Illumina RTA v2.4.11 para generar los datos sin procesar (archivos \*.fastq).

20 25 30 35 40 Las lecturas se asignaron a la secuencia de referencia *Mus musculus GRCm38.p3* usando un alineador de lectura corto basado en Burrows-Wheeler Transform. Se utilizó la tasa de desajuste predeterminada del 2 % (3 desajustes en una lectura de 150 bases). En función de las ubicaciones de lectura asignadas en los archivos de alineación (archivos \*.bam), se determinó la frecuencia con la que se asignaba una lectura en una transcripción. Los recuentos se guardaron en archivos de recuento, que sirvieron como entrada para el análisis de expresión diferencial de mRNA-seq aguas abajo. Los recuentos de lectura se cargaron en el paquete DESeq, un paquete estadístico dentro de la plataforma R. DESeq se desarrolló específicamente para normalizar los datos de RNA-seq para diferentes muestras y encontrar genes expresados diferencialmente entre dos condiciones para datos de RNA-seq para estimar la relación entre la media y la varianza de cada gen (Anders et al., 2013). Además, permite incluir fácilmente factores de escala en la prueba estadística. Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando un umbral de significación de  $P < 0,01$  y los genes se usaron como entrada para el análisis de vías a través de la suite Ingenuity Pathway Analysis (IPA por sus siglas en inglés) (consultado en 2016).

45 50 55 60 El análisis del regulador aguas arriba se realizó utilizando el software IPA (Kramer et al., 2014). Este análisis determina el estado de activación de los factores de transcripción en función de la expresión génica diferencial observada. Esto da como resultado un valor  $P$  superpuesto y una puntuación  $z$  de activación para cada factor de transcripción en la base de conocimientos de IPA. El valor  $P$  de superposición indica la importancia de la superposición entre los genes diana conocidos de un factor de transcripción y los genes expresados diferencialmente medidos en un experimento. La puntuación  $z$  de activación indica la activación (puntuación  $z$  positiva) o la inhibición (puntuación  $z$  negativa) de un factor de transcripción en particular. Una puntuación  $z$  de activación  $<-2$  o  $>2$  indica una inhibición o activación significativa de una vía o proceso.

### Resultados ómicos

La secuenciación de próxima generación se realizó en muestras de ARNm de hígado de ratones tratados para obtener información sobre los mecanismos y vías subyacentes. Se realizaron dos análisis para obtener información sobre los mecanismos y vías subyacentes.

50 55 60 Primero, un análisis de enriquecimiento del análisis de vías canónicas reveló que OCA regulaba varios procesos inflamatorios (Figura 6A). La figura traza cada ruta como una función de -log  $p$ -valor (como referencia, un valor transformado para  $p < 0,05$  es 1,3,  $p < 0,0001$  es 4, para  $p < 0,000005$  es 5,3, etc.). Las vías reguladas con la monoterapia con OCA estaban relacionadas con la señalización de células T y B, la señalización de extravasación de leucocitos, la señalización de células asesinas naturales, etc. La dosis baja de fenofibrato no tuvo efecto en estas vías. Cuando se combinó OCA con la dosis baja de fenofibrato, algunas de las mismas vías estaban fuertemente reguladas (en el caso de la señalización de iCOS-iCOSL en células T auxiliares, señalización de extravasación de leucocitos, receptores de reconocimiento de patrones, fagocitosis mediada por receptores de FC en macrófagos, y formación de fagosomas). Además, otras vías (p. ej., biosíntesis de colesterol I y II, b-oxidación de ácidos grasos) que no estaban significativamente reguladas por ninguno de los agentes solos estaban reguladas por la combinación (Figura 6B). Al igual que con los datos histológicos, la dosis alta de fenofibrato tuvo un efecto sólido en estas vías, pero no mejoró con la administración conjunta de OCA.

65 Se realizó un análisis más detallado de las vías involucradas en la señalización de extravasación de leucocitos. La extravasación de leucocitos es esencial para los procesos fisiopatológicos en NASH (y otras enfermedades). Estos procesos incluyen la migración de linfocitos T para la vigilancia inmunitaria, el reclutamiento de linfocitos y granulocitos activados durante las respuestas inflamatorias agudas y crónicas, y la localización y movilización de células progenitoras hematopoyéticas. Los efectos de mantener a los ratones con una dieta alta en grasas del estudio ilustran estos procesos donde los genes se regulan significativamente al alza y a la baja. La Tabla 3 describe los efectos de una dieta alta en

grasas sobre la señalización de extravasación de leucocitos en ratones mantenidos con una dieta alta en grasas en relación con ratones mantenidos con comida estándar, y también los efectos del tratamiento combinado en relación con una dieta alta en grasas.

Tabla 3

Gen	Nombres completos	Función predicha	Significativamente dieta NASH vs. pienso	Significativamente regulado por dieta NASH
CD43	Grupo de diferenciación 43 o leucosialina	Sialoglucoproteína principal ubicada en la superficie de los linfocitos T, monocitos, granulocitos y algunos linfocitos B.	↑	↓
CD44	Grupo de diferenciación 44	Glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión y migración celular	↑	↓
CDH5	Cadherina 5 o CD144	Imparte a las células la capacidad de adherirse de manera hemofílica y controla la cohesión y organización de las uniones intercelulares	↑	↔
CRK	CT10 regulador de quinasa o p38	Proteína adaptadora en vías de señalización intracelular	↓	↔
CXCR4	Receptor 4 de motivo C-X-C de quimiocina o CD184	Receptor de actividad quimiotáctica para linfocitos	↑	↓
ERM	Familia de proteínas Exrin, Radixin, Moesin	Entrecruza los filamentos de actina con las membranas plasmáticas	↓	↓
EPAC	Proteína de intercambio activada por AMPc	Sensores intracelulares para cAMP	↓	↔
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1 o CD54	Glicoproteína de la superficie celular que se une a las integrinas	↑	↓
ITGA4	Subunidad de integrina alfa	Subunidad grande del receptor de localización de linfocitos a4b1	↑	↓
Gen	Nombres completos	Función predicha	Significativamente dieta NASH vs. pienso	Significativamente regulado por dieta NASH
ITGAL	Integrina alfa L o CD11A	Adhesión celular y señalización coestimuladora	↑	↓
ITGAM	Integrina Alfa M o CD11B	Regula la adhesión y migración de leucocitos	↑	↓
ITGB1	Integrina Beta-1 o CD29	Las integrinas participan en la adhesión celular y la señalización mediada por la superficie celular	↓	↔
ITGB2	Integrina Beta-2 o CD18	Las integrinas participan en la adhesión celular y la señalización mediada por la superficie celular	↑	↓
JAM2	Molécula 2 de adhesión unión o CD322	Ligando adhesivo para interactuar con múltiples tipos de células inmunitarias y localización de linfocitos	↑	↔
JAM3	Molécula 3 de adhesión unión	Se une con JAM2 en la regulación de la adherencia.	↓	↔

LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos	Molécula de adhesión en células T, células B, macrófagos y neutrófilos	↔	↓
NCF1	Factor citosólico de neutrófilos-1	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos	↑	↓
NCF2	Factor citosólico de neutrófilos-2	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos	↑	↓
NCF4	Factor citosólico de neutrófilos-4	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos	↑	↓
NOX	NADPH oxidasa	Enzimas que transportan electrones a través de la membrana plasmática y generan superóxidos y especies reactivas de oxígeno corriente abajo	↑	↓
PECAM1	Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas o CD31	Transmigración de leucocitos, angiogénesis y activación de integrinas	↑	↔
PKC	Proteína quinasa C	Parte de la familia de enzimas que controlan la fosforilación de los aminoácidos serina y treonina en otras proteínas	↔	↔
PI3K	PI3-quinasas	Las PI3K son una familia de enzimas transductoras de señales intracelulares relacionadas	↔	↓
Gen	Nombres completos	Función predicha	Significativamente dieta NASH vs. pienso	Significativamente regulado por dieta NASH
PLC	Fosfolipasa C	cataliza la formación de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	↔	↓
PSGL-1	P-selectina glicoproteína ligando 1	Papel en el tráfico de leucocitos durante la inflamación mediante la unión de leucocitos a plaquetas activadas o endotelios que expresan selectinas	↑	↓
Rac2	Sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras	Regula diversos eventos celulares, incluido el crecimiento, la reorganización del citoesqueleto y la activación de proteínas quininas	↑	↓
RASGRP1	Proteína liberadora de nucleótidos de guanilo RAS	Activa la cascada de cinasas Erk/MAP y regula el desarrollo, la homeostasis y la diferenciación de las células T y B	↑	↓
RhoH	gen H homólogo de Ras	Regula la dinámica de actina intracelular	↑	↓
RhoGAP	RHO GTPasas	Dominio proteico de proteínas activadoras de GTPasa	↔	↓
SPA-1	Proteína asociada a la proliferación inducida por señal 1	Puede obstaculizar la progresión del ciclo celular inducida por mitógenos cuando se expresa de manera anormal	↑	↔
THY-1	Antígeno de diferenciación de timocitos 1 o CD90	Las interacciones célula-célula y célula-matriz pueden afectar el crecimiento de neuritas, la	↑	↓

		regeneración nerviosa, la apoptosis, la metástasis, la inflamación y la fibrosis.		
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteínasas	Se unen e inactivan las metaloproteínasas tisulares	↔	↓
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores	Participa en las vías de señalización intracelular que regulan las interacciones de la matriz extracelular con la integrina	↑	↓
VAV	VAV	Un protooncogén que media en la activación inducida por antígeno de los linfocitos B	↑	↓
VCAM1	Proteína de adhesión de células vasculares 1 o CD 106	Adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos al endotelio vascular	↑	↓
AVISPA	Síndrome de Wiskott-Aldrich)	Importante en la motilidad de los leucocitos in vivo	↔	↓

La transmigración y extravasación de leucocitos a través del endotelio se produce en varios pasos distintos, incluido el rodamiento de los leucocitos sobre las células endoteliales, mediado por interacciones débiles transitorias entre moléculas de adhesión. Posteriormente, los leucocitos débilmente adheridos están tan cerca del endotelio que son activados por citoquinas quimiotácticas, presentes en la superficie apical del endotelio. A continuación, los leucocitos activados se propagan y se adhieren firmemente al endotelio formando estructuras de acoplamiento y finalmente migran a través de las hendiduras intercelulares entre las células endoteliales hacia el tejido subyacente.

5 La administración de OCA regula a la baja numerosos genes implicados en este proceso de la cascada inflamatoria dentro del leucocito (WAP, Rac2, RASGRP1, Vav, PKC, PI3K, ERM, ITGAL y PSGL-1) así como dentro de las células endoteliales (VCAM1, PI3K, ERM, NOX, CYBA, PKC, NCF1 y 2). La regulación génica dentro de estas vías no fue evidente después de la administración de una dosis baja de fenofibrato solo.

10 15 Cuando OCA se combinó con una dosis de fenofibrato que no fue eficaz para regular estas vías, ahora se regulan múltiples genes adicionales que apuntan a un efecto sinérgico. Dentro del leucocito, estos genes adicionales incluían CD43, PSGL-1, CXCR4, ITGAM, ITGB2, Rap1, ITGA4. Dentro de la célula endotelial, estos genes adicionales incluían ICAM1, RhoGAP, VASP, NCF4, ITGAM, ITGB2, ITGA4 e ICAM-1.

20 Como se señaló anteriormente, la dosis alta de fenofibrato tuvo numerosos efectos en esta vía que no mejoraron con la administración conjunta de OCA. Todos los análisis posteriores se centraron en las monoterapias a dosis bajas y en combinación (OCA 10 mg/kg +/- fenofibrato 10 mg/kg).

25 30 En un segundo análisis, se compararon los genes diferencialmente regulados entre la combinación de dosis baja y cada monoterapia respectiva. Esto difiere de los primeros análisis de expresión génica (descritos anteriormente) que se centraron en las comparaciones relativas al grupo del vehículo; el análisis a continuación compara cada monoterapia con la combinación. El diagrama de Venn (Figura 7A) muestra que OCA tiene 109 genes regulados de forma única, el fenofibrato tiene 92 genes regulados de forma única y 6 genes regulados comúnmente. La combinación reguló 517 genes superpuestos con OCA, 75 con fenofibrato y 5 genes eran comunes a todos. Cabe destacar que la combinación reguló un total de 912 genes únicos. Un enriquecimiento posterior de la ruta destaca los procesos biológicos donde están involucrados los genes combinados (Figura 7B).

35 Se realizaron análisis de vías posteriores tanto para la extravasación de leucocitos (*por ejemplo*, como arriba pero esta vez las comparaciones son entre la combinación y cada monoterapia. Para la extravasación de leucocitos, las comparaciones de la combinación frente a cada monoterapia revelaron que había una serie de genes regulados de manera única consistentes con los cambios antiinflamatorios mejorados observados histológicamente en los ratones tratados con la combinación (Tabla 4).

Tabla 4.

Gen	Nombres completos	Función predicha	Combinación versus monoterapia con fenofibrato	Combinación vs. Monoterapia OCA

CD44	Grupo de diferenciación 44	Glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión y migración celular		↓
CXCR4	Receptor 4 de motivo C-X-C de quimiocina o CD184	Receptor de actividad quimiotáctica para linfocitos		↓
CYBA1	Citocromo b (-245)	Codifica una cadena ligera del citocromo b(-245) que es un componente del complejo NOX		↓
ERM	Familia de proteínas Exrin, Radixin, Moesin	Entrecruza los filamentos de actina con las membranas plasmáticas		↓
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1 o CD54	Glicoproteína de la superficie celular que se une a las integrinas	↓	↓
ITGA4	Subunidad de integrina alfa	Subunidad grande del receptor de localización de linfocitos a4b1	↓	↓
ITGAL	Integrina alfa L o CD11A	Adhesión celular y señalización coestimuladora		↓
ITGAM	Integrina Alfa M o CD11B	Regula la adhesión y migración de leucocitos		↓
ITGB2	Integrina Beta-2 o CD18	Las integrinas participan en la adhesión celular y la señalización mediada por la superficie celular	↓	↓
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos	Molécula de adhesión en células T, células B, macrófagos y neutrófilos	↓	↓
MMP9	Metaloproteasa de matriz 9	Degrada el colágeno de la matriz extracelular		↓
NCF1	Factor citosólico de neutrófilos-1	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos		↓
NCF2	Factor citosólico de neutrófilos-2	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos		↓
NCF4	Factor citosólico de neutrófilos-4	Una subunidad de la NADPH oxidasa de los neutrófilos		↓
NOX	NADPH oxidasa	Enzimas que transportan electrones a través de la membrana plasmática y generan superóxidos y especies reactivas de oxígeno corriente abajo		↓
PKC	Proteína quinasa C	Parte de la familia de enzimas que controlan la fosforilación de los aminoácidos serina y treonina en otras proteínas		↓
PI3K	PI3-quinasas	Las PI3K son una familia de enzimas transductoras de señales intracelulares relacionadas	↓	↓
PLC $\square$	Fosfolipasa C	cataliza la formación de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato		↓
PSGL-1	P-selectina glicoproteína ligando 1	Papel en el tráfico de leucocitos durante la inflamación mediante la unión de leucocitos a plaquetas activadas o endotelios que expresan selectinas	↓	↓

Rac2	Sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras	Regula diversos eventos celulares, incluido el crecimiento, la reorganización del citoesqueleto y la activación de proteínas quinasas		↓
Rap1GAP	Proteína activadora de GTPasa RAP1 1	RAP1 es de particular interés ya que se ha demostrado que es un antagonista de RAS y es capaz de suprimir la transformación celular.		↓
RASGRP 1	Proteína liberadora de nucleótidos de guanilo RAS	Activa la cascada de cinasas Erk/MAP y regula el desarrollo, la homeostasis y la diferenciación de las células T y B		↓
RhoH	gen H homólogo de Ras	Regula la dinámica de actina intracelular		↓
RhoGAP	RHO GTPasas	Dominio proteico de proteínas activadoras de GTPasa		↓
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas	Se unen e inactivan las metaloproteinasas tisulares		↓
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores	Participa en las vías de señalización intracelular que regulan las interacciones de la matriz extracelular con la integrina		↓
VAV	VAV	Un protooncogén que media en la activación inducida por antígeno de los linfocitos B		↓
VCAM1	Proteína de adhesión de células vasculares 1 o CD 106	Adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos al endotelio vascular		↓
WASP	Síndrome de Wiskott-Aldrich)	Importante en la motilidad de los leucocitos in vivo		↓

5 Dada la progresión de la inflamación a la fibrosis en NASH, y la observación de que las vías de fibrosis hepática/HSC surgieron como significativamente reguladas en la combinación, también examinamos las vías en las HSC. Cuando se compara con la monoterapia, está claro que se regulan más genes en la combinación frente a fenofibrato solo y se regulan menos genes en la combinación frente a OCA. En otras palabras, con respecto a estas vías fibróticas, existe claramente una interacción entre ambos agentes, pero la porción OCA de la combinación puede estar impulsando estos efectos con más fuerza.

#### 10 Interpretación y Relevancia

10 La importancia de la activación de FXR en la prevención de la fibrosis y la inflamación se demuestra en los hígados de ratones knockout para FXR que muestran una expresión elevada de genes inflamatorios (Kim 2007) con lesiones e inflamación progresivas relacionadas con la edad (Yang 2007). De acuerdo con estos informes, OCA ejerció propiedades antiinflamatorias en células HepG2 y hepatocitos primarios de ratón. Las células HepG2 pretratadas con OCA y luego expuestas a estímulos proinflamatorios exhibieron una reducción del 50% al 60% en los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$ , inducción de ciclooxygenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible estimulada por TNF- $\alpha$  (iNOS) expresión. Asimismo, los hepatocitos primarios tratados con OCA mostraron una inducción atenuada (en un 40% a un 50%) de la iNOS y la expresión del gen de la proteína quimioatractante de monocitos 1 (MCP-1) en respuesta a estímulos proinflamatorios (Wang 2008). Los efectos del OCA sobre los mecanismos de migración celular no se han estudiado directamente; sin embargo, el OCA inhibió la producción de iNOS o COX-2 inducida por IL-1 $\beta$  y eliminó la migración de células del músculo liso aórtico de rata inducida farmacológicamente (Li 2007). Se ha demostrado una inhibición similar de los infiltrados inflamatorios con OCA en el tejido intestinal de dos modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal (DSS y ácido trinitrobenceno sulfónico) (Gadaleta 2011) y el riñón de un modelo de rata con diabetes tipo 1 (Wang 2010). Por lo tanto, la observación de efectos antiinflamatorios mejorados por OCA sugiere que los cambios en la expresión génica con OCA en combinación con fenofibrato podrían mejorar la inhibición de la inflamación y la migración de células inflamatorias en varias enfermedades.

20 **Ejemplo 3:** NASH inducida por dieta en ratones ob/ob con deficiencia de leptina

Este experimento se realizó para evaluar el efecto de 8 semanas de tratamiento con OCA y atorvastatina solos y en combinación en la etapa de fibrosis (pre-biopsia vs. post-biopsia) en ratones ob/ob-NASH machos con deficiencia de leptina.

5 *Animales, alojamiento y dieta.*

Se adquirieron ratones masculinos *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* (a las 5 semanas de edad) de JanVier, Francia. Durante el período de aclimatación e inducción de la dieta, los ratones se alojaron en grupos de cinco por jaula en gabinetes hechos a la medida bajo un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 (luces encendidas de 3 a. m. a 3 p. m.) en condiciones de temperatura controlada (22 ± 1 °C; 50 ± 10% de humedad relativa). A lo largo de la inducción de la dieta y el período de estudio, los ratones tuvieron acceso ad libitum a la dieta NASH personalizada (S8189, Ssniff, Alemania) (40 % de grasa, 40 % de carbohidratos (20 % de fructosa) y 2 % de colesterol) o pienso para roedores regular (ob /ob-pienso) (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca) y agua del grifo. Los animales se mantuvieron con la dieta durante un total de 18 semanas antes de la intervención y se mantuvieron con la dieta durante todo el período de estudio. Los animales se alojaron individualmente durante la recuperación postoperatoria y durante todo el período de estudio.

*Grupos de tratamiento*

20 Grupo 1: *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* -Vehículo NASH

A los ratones (n=10) se les administró vehículo por vía oral (0,5 % CMC) en un volumen de 5 ml/kg una vez al día desde la semana 0 a la 8.

25 Grupo 2: *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* -NASH OCA

A los ratones (n=10) se les administró por vía oral vehículo suplementado con OCA a una dosis de 30 mg/kg una vez al día desde la semana 0 a la 8.

30 Grupo 3: *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* -NASH

A los ratones (n=11) se les administró vehículo por vía oral suplementado con atorvastatina a una dosis de 10 mg/kg una vez al día desde la semana 0 a la 8.

35 Grupo 4: *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* -NASH OCA + Atorvastatina

A los ratones (n=9) se les administró por vía oral un vehículo complementado con una combinación de OCA a una dosis de 30 mg/kg y atorvastatina a una dosis de 30 mg/kg una vez al día.

40 *Asignación a los estudios, aleatorización estratificada y seguimiento inicial*

Después de 15 semanas de inducción de la dieta (3 semanas antes del inicio del estudio), se obtuvo una biopsia hepática para evaluar la progresión hepática de la fibrosis y la esteatosis, y para la evaluación del estadio de fibrosis hepática. En la semana -1, se realizó una aleatorización estratificada en grupos de tratamiento según el estadio de fibrosis hepática, la puntuación de esteatosis y el peso corporal.

45 *Procedimiento previo a la biopsia*

El día de la operación, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (2-3%) en oxígeno al 100%. Se hizo 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 de corte del hígado se electrocoaguló instantáneamente usando coagulación bipolar (unidad electroquirúrgica ERBE VIO 100). Se devolvió el hígado a la cavidad abdominal y se suturó el abdomen y se cerró la piel con grapadoras. El día de la operación, los ratones recibieron solución salina calentada (0,5 ml) para rehidratación. Para la recuperación postoperatoria, se administraron por vía subcutánea carprofeno (5 mg/ml – 0,01 ml/10 g) y enrofloxacina (5 mg/ml – 1 ml/kg) el día de la operación y los días 1 y 2 posteriores a la operación.

55 *Preselección para la evaluación del nivel hepático de esteatosis y fibrosis*

Preparación de biopsia hepática para evaluación histológica: Despues del almacenamiento durante la noche en PFA al 4 %, las biopsias de hígado se infiltraron durante la noche en parafina en un procesador de tejidos VIP Tissue-TEK de Miles Scientific automatizado y, posteriormente, se incluyeron en bloques de parafina. Se incluyeron biopsias de cinco animales diferentes en un bloque. Luego se recortaron los bloques y se cortaron dos secciones de 3 µm (una para Sirius Red y otra para tinción con H&E) en un micrótomo 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 estadio de fibrosis para la estratificación y la aleatorización en grupos de tratamiento se realizó según lo descrito por Kleiner et al. (2005) (ver más abajo).

***Biomarcadores plasmáticos basales y finales***

Las muestras de sangre para medir los niveles de triglicéridos en plasma sin ayunar (alimentados) se obtuvieron por la mañana (7-8 AM) al inicio del estudio y en la semana 8 de tratamiento. Las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola (por corte) en un estado consciente. La última dosis del fármaco se administró ~18 horas antes de la toma de muestras de sangre. Los ratones se volvieron a alimentar después de la toma de muestras de sangre.

***Terminación y Necropsia***

10 Los animales se sacrificaron en la semana 8 en un estado sin ayuno. Se administró la última dosis del fármaco ~18 horas antes de la finalización y los animales no recibirán la dosificación del fármaco antes de la finalización. Los animales fueron inducidos por CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> y durante la anestesia (isoflurano), se abre la cavidad abdominal y se obtiene sangre del corazón para la recolección de plasma terminal. Tras la necropsia, se recogió y pesó el hígado completo. Se extirpó una biopsia del lóbulo lateral izquierdo y se fijó en PFA al 4% para análisis histológico y bioquímico. El lóbulo medio se dividió en pedazos y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido para análisis bioquímico (TG). El tejido hepático restante se fijó posteriormente en PFA al 4% para una histología opcional posterior.

***Procesamiento de tejido hepático***

20 Biopsia previa al estudio: Aproximadamente tres semanas antes del inicio del estudio, se extirpó una cuña en forma de cono de tejido hepático (~100 mg) de la porción distal del lóbulo lateral izquierdo, se pesó y se colocó inmediatamente en PFA al 4 %.

25 Tejido hepático terminal: Despues de 8 semanas de tratamiento, se recogió y pesó todo el hígado y se extirpó una biopsia de hígado del lóbulo lateral izquierdo y se colocó inmediatamente en PFA al 4% (~150-200 mg). Las piezas del lóbulo mediano se congelarán rápidamente en criotubos (RNAseq) (~100 mg) y en tubos FastPrep para TG (~100 mg) y para TC (~50 mg).

30 Fijación, empotramiento y cortes para histología: Despues de una fijación durante la noche en PFA al 4 %, las biopsias de hígado se infiltraron durante la noche en parafina en un procesador de tejidos VIP Tissue-TEK de Miles Scientific automatizado y, posteriormente, se incluyeron en bloques de parafina. Se incluyeron biopsias de cinco animales diferentes en un bloque. Se recortaron los bloques y se cortaron dos secciones de 3 µm por bloque en un micrótomo Microm HM340E (Thermo Scientific). Se colocó una sección de dos bloques diferentes en un portaobjetos dando un total de 10 biopsias por portaobjetos como se describe anteriormente.

***Etapa de fibrosis***

35 Se recolectó tejido hepático antes y después de la biopsia del lóbulo lateral izquierdo para evaluar el estadio de fibrosis mediante el uso de los criterios clínicos descritos por Kleiner y colegas (Diseño y validación de un sistema de puntuación histológica para la enfermedad del hígado graso no alcohólico, Kleiner et al, Hepatology 41; 2005) y se reproduce en la Tabla 5 a continuación. La Figura 4 describe el efecto de OCA y atorvastatina solos y en combinación sobre la puntuación de fibrosis. La combinación de OCA y atorvastatina muestra una tendencia a reducir la puntuación de fibrosis aunque no de forma significativa respecto al vehículo (valor de p = 0,09).

45

Tabla 5

Característica	Grado	Puntaje
Fibrosis	Ninguna	0
	Perisinusoidal o periportal	1
	Leve, zona 3, perisinusoidal	1A
	Moderado, zona 3, perisinusoidal	1B
	portal/periportal	1C
	Perisinusoidal y portal/periportal	2
	Fibrosis puente	3
	Ninguna	0

***Triglicéridos plasmáticos***

50 Niveles de triglicéridos: Se recogen 100 µl de sangre en tubos de heparina de litio. El plasma se separó y las muestras se almacenaron a -80 grados centígrados hasta su análisis. Los niveles de triglicéridos se midieron en determinaciones

únicas utilizando el autoanalizador Cobas C-111 con kit comercial (Roche Diagnostics, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se indica en las Figuras 5A y 5B, la combinación de OCA y atorvastatina redujo los niveles de triglicéridos de manera estadísticamente significativa.

5 **Ejemplo 4:** Cultivo emparedado de hepatocitos

Este experimento se realizará para evaluar el efecto de OCA en combinación con un PPAR agonista o estatina para determinar su capacidad para alterar la síntesis de colágeno en los hepatocitos humanos.

10 **Reactivos y Soluciones**

El medio de cultivo celular adecuado incluye MB-752/1 de Waymouth, F12 de Ham, RPMI 1640, medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio E de Williams, L15 de Leibovitz y medio de Chee modificado. Al medio de cultivo se le añade colagenasa tipo IV, colágeno tipo I, Percoll, medio de cultivo y suplementos (*por ejemplo*, suero, antibióticos, 15 aminoácidos, hormonas como DEX, insulina y factores de crecimiento), tampón de perfusión y otras soluciones estaban disponibles comercialmente o se fabricaban a partir de materiales disponibles comercialmente. En el cultivo emparedado de hepatocitos se pueden utilizar otros tipos de colágeno (tipos II-IV), laminina, fibronectina y proteoglicanos de sulfato de heparina. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno tipo I y IV son superiores a la fibronectina y la laminina.

20 **Aislamiento de hepatocitos**

Se utilizará el método de perfusión de colagenasa de dos pasos *in situ* para aislar los hepatocitos. Brevemente, se aislarán hepatocitos de ratas Lewis hembra. Los animales serán anestesiados. Primero se perfundirá el hígado a través de la vena porta *in situ* con un tampón de perfusión. El perfundido se equilibrará antes de entrar en el hígado. El hígado se perfundirá posteriormente con colagenasa en el tampón de perfusión. Luego, el hígado se disecará y se transferirá a 25 tampón de perfusión enfriado con hielo. La cápsula del hígado se romperá y la suspensión celular resultante se filtrará. El sedimento celular se recogerá por centrifugación y se resuspenderá. Se agregará Percoll a la suspensión y los hepatocitos se separarán mediante una técnica de centrifugación de densidad de Percoll. La mezcla se centrifugará y el 30 sedimento celular se lavará dos veces con medio. La viabilidad de los hepatocitos se determinará por exclusión con azul tripán. Como alternativa, se pueden utilizar hepatocitos criopreservados en lugar de hepatocitos recién aislados.

**Cultivo emparedado de hepatocitos**

35 Los hepatocitos aislados se cultivarán en placas de cultivo de tejido recubiertas de colágeno y se mantendrán en un medio de cultivo suplementado con suero, penicilina, estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico, insulina, glucagón e hidrocortisona. Se preparará una solución gelificante de colágeno mezclando solución de colágeno tipo I y medio de cultivo. Las placas de cultivo de tejidos se recubrirán con la solución gelificante y se incubarán a 37 °C para promover la formación de gel. Los hepatocitos se sembrarán a una densidad adecuada y se mantendrán a 37°C. El medio de cultivo será reemplazado cada 24 horas.

40 Para el sistema emparedado, se distribuirá una solución de gel de colágeno adicional sobre las células después de 1 día de cultivo. El medio de cultivo se retirará con cuidado para garantizar que la segunda capa de gel de colágeno se distribuya uniformemente por toda la placa. Las placas de cultivo se incubarán 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 cambiará diariamente. Las 45 muestras medianas se almacenarán a -20 °C para su posterior análisis.

Los hepatocitos cultivados entre capas de colágeno gelificado mantienen una forma cuboide tridimensional y una distribución de las proteínas del citoesqueleto similar a la observada *in vivo*.

**Optimización de la formación de redes canaliculares biliares**

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

**Artículos de prueba**

55 El agonista de FXR previsto para el estudio es el ácido obeticólico, también conocido como "OCA" y ácido 6-etyl quenodesoxicólico (6-ECDCA).

60 Los agonistas de PPAR-alfa previstos para el estudio incluyen uno o más de clofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, bezafibrato, y fenofibrato.

Un agonista dual de PPAR-alfa/delta es el ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico.

65 Un agonista PPAR $\delta$  (delta) previsto para el estudio es GW501516.

Las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) previstas para el estudio incluyen atorvastatina (Lipitor), rosuvastatina (Crestor) y simvastatina (Zócor).

**Ejemplo 5:** Evaluar los efectos de la administración individual de los artículos de prueba en los perfiles de lípidos

5 El potencial de 5 artículos de prueba, un agonista de FXR, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa/delta (o alternativamente, un agonista de PPAR-alfa y un agonista de PPAR-delta juntos) y una estatina se evaluará para determinar la capacidad de alterar la síntesis de colesterol y el perfil lipídico en hepatocitos humanos. Los cambios se evaluarán en hepatocitos humanos cultivados en emparedado (SCHH por sus siglas en inglés) 10 después de 72 horas de exposición a artículos de prueba en 3 concentraciones diferentes. Las soluciones de dosificación se prepararán diariamente en medios de cultivo y la dosificación de SCHH se realizará diariamente durante 3 días. El experimento se realizará en formato de 24 pocillos utilizando un (1) lote de hepatocitos humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se realizará en tres (3) pocillos para proporcionar datos por triplicado (expresados como media ± desviación estándar). Las placas tratadas con control de solvente se utilizarán como control y se evaluarán para 15 la función de referencia. Al final del período de prueba, se agregará el estándar interno a los pocillos individuales, seguido de la adición del reactivo de extracción para el perfil de lípidos global. Las muestras se agitarán durante 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugarán. El sobrenadante se evaporará a sequedad bajo nitrógeno, se resuspenderá y analizará.

20 El perfil de lípidos global se realizará mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC por sus siglas en inglés) y EM de alta resolución. Los extractos de muestras de metil-t-butilo se analizarán en instrumentación UPLC-MS (Synapt G2 Ion-Mobility QToF), en modo ESI+ y ESI-, para cubrir una amplia gama de polaridad de lípidos y composición química. Inicialmente, se aplicará UPLC para evaluar los efectos de los compuestos en una gran variedad (5000 a 8000) de lípidos, 25 incluidos múltiples ésteres de colesterol. Se realizará un análisis colorimétrico para medir el colesterol total. Según la abundancia, la mayoría serán glicerofosfolípidos, sin embargo, se evaluará una gran cantidad de clases. Los perfiles se evaluarán para identificar los efectos potenciales sobre los lípidos individuales. La identificación de lípidos específicos se puede realizar frente a estándares utilizando el tiempo de retención del ensayo, la masa exacta y la fragmentación. Dependiendo del resultado, se pueden identificar lípidos o clases de lípidos específicos para evaluación en los Ejemplos 30 6 y 7. Se repetirá un estudio de confirmación en dos lotes adicionales de hepatocitos humanos Transporter Certified™ (N=2).

**Ejemplo 6:** Evaluar los efectos de las combinaciones duales de artículos de prueba en los perfiles de lípidos

35 Combinaciones de agonistas de FXR, con cada uno de un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta (o, como alternativa, un agonista de FXR con un agonista de PPAR alfa y un agonista de PPAR delta), y/o una estatina se evaluará por su potencial para alterar la síntesis de colesterol y el perfil de lípidos en los hepatocitos humanos. Las combinaciones específicas evaluadas serán:

40 • Agonista de FXR con agonista de PPAR-alfa  
 • Agonista de FXR con agonista de PPAR-delta  
 • Agonista de FXR con agonista dual de PPAR-alfa y delta y/o agonista de FXR con agonista de PPAR-alfa y agonista de PPAR-delta  
 • Agonista de FXR con una estatina  
 45 Los cambios se evaluarán en hepatocitos humanos cultivados en emparedado (SCHH) después de 72 horas de exposición a artículos de prueba en 3 concentraciones diferentes. Las soluciones de dosificación se prepararán diariamente en medios de cultivo y la dosificación de SCHH se realizará diariamente durante 3 días. El experimento se realizará en formato de 24 pocillos utilizando un (1) lote de hepatocitos humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se realizará en tres (3) pocillos para proporcionar datos por triplicado (expresados como media ± desviación estándar). Las muestras se prepararán y analizarán para el perfil de lípidos global como se detalla en el Ejemplo 5. Las alteraciones en los perfiles de lípidos y la síntesis de colesterol se compararán con los efectos de la administración individual en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 7:** Evaluar los efectos de combinaciones triples de artículos de prueba en perfiles de lípidos

55 55 La combinación triple de un agonista de FXR, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta (o un agonista de PPAR-alfa en combinación con un agonista de PPAR-delta) y/o una estatina se evaluará para el potencial para alterar la síntesis de colesterol y el perfil de lípidos en los hepatocitos humanos. Los cambios se evaluarán en hepatocitos humanos cultivados en emparedado (SCHH) después de 72 horas de exposición a artículos de prueba en 3 concentraciones diferentes. Las soluciones de dosificación se prepararán diariamente en medios de cultivo y la dosificación de SCHH se realizará diariamente durante 3 días. El experimento se realizará en formato de 24 pocillos utilizando un (1) lote de hepatocitos humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se realizará en tres (3) pocillos para proporcionar datos por triplicado (expresados como media ± desviación estándar). Las muestras se prepararán y analizarán para el perfil de lípidos global como se detalla en el Ejemplo 2. Las alteraciones en los perfiles de lípidos y la síntesis de colesterol se compararán con los efectos de las combinaciones administradas en el Ejemplo 2. Las combinaciones específicas evaluadas serán:

- 5           • Agonista de FXR con un agonista de PPAR-alfa y una estatina  
           • Agonista de FXR con un agonista de PPAR-delta y una estatina  
           • Agonista de FXR con un agonista dual de PPAR-alfa y delta (o, como alternativa, un agonista de PPAR-alfa y un agonista de PPAR-delta), y una estatina

10           Las muestras se prepararán y analizarán para el perfil de lípidos global como se detalla en el Ejemplo 4. Las alteraciones en los perfiles de lípidos y la síntesis de colesterol se compararán con los efectos de las combinaciones administradas en los Ejemplos 4 y 5.

15           **Ejemplo 8: Estudios animales**

20           *Animales*

25           Los animales se alojarán individualmente en jaulas estándar a 22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. A los ratones macho C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se les permitirá acceso ad libitum a una dieta enriquecida en grasas (40 % kcal, manteca vegetal Primex parcialmente hidrogenada), fructosa (22 % en peso) y colesterol (2% en peso) (Research Diets, New Brunswick, NJ, No. de cat. D09100301). Se usará una dieta baja en grasas (10 % kcal; en lo sucesivo denominada LFD) sin fructosa ni colesterol como dieta de control (Dietas de investigación, No. de cat. D09100304). El uso de este LFD validado establece un grupo de ratones de control que mantienen un fenotipo hepático "normal" para compararlo con los animales alimentados con la dieta experimental.

30           *Grupos de tratamiento*

- 35           Control HFD:  
           Control LFD:  
           Agonista de FXR + HFD:  
           HFD + PPAR $\alpha$  (es decir, fenofibrato, gemfibrozilo, bezofibrato o ciprofibrato):  
           HFD + PPAR $\delta$  (es decir, GW501516):  
           HFD + PPAR $\alpha$  + PPAR $\delta$ :  
           HFD + PPAR dual  $\alpha/\delta$  (es decir, GFT505):  
           HFD + Estatina (es decir, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina)  
           HFD + Agonista de FXR + PPAR $\alpha$ :  
           HFD + Agonista de FXR + PPAR $\delta$ :  
           HFD + Agonista de FXR + PPAR $\alpha$  + PPAR $\delta$ :  
           HFD + agonista de FXR + PPAR dual  $\alpha/\delta$ :  
           HFD + agonista de FXR + Estatina:

40           *Histología y análisis de imagen digital*

45           Al finalizar, se extirparán los lóbulos lateral izquierdo y/o medial derecho del hígado ( $\geq 50$  % de cada lóbulo recolectado) y se fijarán en formalina tamponada neutra al 10 % (al menos 7 días a temperatura ambiente). El tejido hepático se extirpará cuidadosamente para seleccionar secciones de tamaño similar representativas tanto del borde como del centro del tejido. El tejido hepático se incluirá en parafina, se seccionará (5  $\mu$ m) y se montará. Las tinciones de hematoxilina y eosina se utilizarán para los análisis morfológicos, y las tinciones de tricrómico de Masson y rojo Sirius se utilizarán para la evaluación de la fibrosis hepática. El análisis histopatológico será realizado por un patólogo ciego al estudio. NAFLD y NASH se calificarán mediante el uso de los criterios descritos por Kleiner y colegas. Para la evaluación cuantitativa de la fibrosis, se escanearán secciones enteras teñidas con rojo Sirius mediante el uso del sistema de escaneo de portaobjetos completos ScanScope CS (Aperio, Vista, CA) con un aumento de x20. Se extraerán las imágenes y se medirán los perfiles de colágeno teñidos con rojo Sirius de tejidos completos mediante el método basado en cubos de color con el software Image-Pro Analyzer (MediaCybernetics v.6.2, Bethesda, MD). La tinción de colágeno total (informada como % del área total) se evaluará de tres a cuatro secciones representativas de cada animal (excepto para el experimento de evaluación integral de la fibrosis hepática donde se evaluarán secciones adicionales). Todos los análisis histológicos se realizarán a ciegas.

55           *Biopsia hepática*

60           Los ratones serán anestesiados con isoflurano (2-3%) en oxígeno al 100%. Se realizará una pequeña incisión abdominal, ~0,5 cm a la izquierda de la línea media y se expondrá el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se extirpará una cuña de tejido hepático (~50 mg) de la porción distal del lóbulo, se colocará inmediatamente en un vial y se congelará en nitrógeno líquido. Se insertará una cuña de esponja de gelatina absorbible (GelFoam, Pfizer, NY) en los bordes cortados del hígado. Una vez que se logra la hemostasia (generalmente dentro de 1 min) y la esponja de gelatina se adhiere bien al sitio de la biopsia, el hígado se devolverá a la cavidad abdominal, se suturará la pared abdominal y se grapará la piel. Los ratones recibirán una inyección única de buprenorfina (0,05 mg/kg, subcutánea) en el momento de la cirugía para controlar el dolor posoperatorio. Los ratones operados de forma simulada se someterán a un procedimiento idéntico excepto que no se realizará una incisión en el hígado.

**Análisis de plasma y suero**

5 Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) se medirán con un bioanalizador Olympus AU400e (Olympus America Diagnostics, Center Valley, PA). Las muestras de plasma se diluirán 1:10 con PBS para la medición de ALT y AST. La adiponectina plasmática total y la insulina sérica en ayunas se medirán de acuerdo con las instrucciones del fabricante con kits de electroquimioluminiscencia disponibles comercialmente (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

**10 Cuantificación del contenido total de lípidos y colágeno hepáticos**

15 Los lípidos hepáticos totales se extraerán del hígado utilizando un protocolo adaptado de Folch *et al.* Se homogeneizará tejido hepático congelado (~0,3 g) en 10 ml de solución de cloroformo-metanol 2:1. El homogeneizado se filtrará con papel de filtro sin grasa y se canalizará a un vial de vidrio de 15 ml previamente pesado. Se agregarán 5 ml adicionales de cloroformo-metanol 2:1 seguidos de 2,5 ml de NaCl al 0,9 %. Los lípidos se separarán por centrifugación a 1.800 g, 10 °C durante 5 min, la capa acuosa se desechará y el tubo se enjuagará con nitrógeno hasta que el sedimento de lípidos esté seco. El tubo que contiene el sedimento de lípidos se volverá a pesar y se calculará el total de lípidos extraídos por gramo de hígado total. El contenido total de colágeno en el hígado se medirá mediante determinación colorimétrica de residuos de hidroxiprolina por hidrólisis ácida de colágeno (Quickzyme, Leiden, Países Bajos).

**20 Determinación de proteína colágeno-1 $\alpha$ 1 extraíble por transferencia de proteína**

25 Se recolectarán núcleos de tejido (50–100 mg) del lóbulo lateral izquierdo del hígado, se congelarán rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenarán a -80 °C hasta que se procesen. El tejido se homogeneizará en tampón de lisis que contiene inhibidores de proteasa. La concentración de proteínas del sobrenadante aclarado se medirá con un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL). Los lisados de tejido hepático (~50  $\mu$ g) se separarán en geles Nupage reductores al 4–12 % (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se transferirán a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se cortarán entre los marcadores de 50 y 60 kDa y se bloquearán con Blotto al 5 %. La mitad superior se probará con anti-colágeno-1 %1 (1:1000; No. de cat. NBP1–30054; Novus Biologicals, Littleton, CO), que detecta la porción del telopeptido COOH-terminal del colágeno-1 %1 proteína. Para la normalización, se probará la mitad inferior con antigliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:7500; No. de cat. 3683; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Despues de la incubación con el anticuerpo anti-conejo de la peroxidasa de rábano picante, la expresión de la proteína se detectará con quimioluminiscencia mejorada (Thermo Scientific, Rockford, IL) y se realizará una densitometría con un sistema FluorChem (Cell Biosciences, Santa Clara, CA). El análisis densitométrico del colágeno-1 $\alpha$ 1 incluirá tanto la proteína madura de 140 kDa como una banda ligeramente más grande, correspondiente a una forma glicosilada o una proteína colágeno-1 $\alpha$ 1 parcialmente procesada.

**Cambios en la expresión de genes hepáticos**

40 Las muestras de tejido del lóbulo lateral izquierdo del hígado se recolectarán con una herramienta de extracción de muestras de tejido de 6 mm o mediante el método de biopsia, se congelarán instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenarán a -80 °C hasta que se procesen. El ARN total de muestras de hígado (~50–150 mg) se extraerá mediante el uso de TRI Reagent (Life Technologies) y luego se purificará con un kit Qiagen RNeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia, CA). La integridad del ARN se determinará utilizando el nano kit Agilent 6000 en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El ADNc se preparará utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies). Los cambios en la expresión génica se confirmarán mediante ensayos de expresión génica TaqMan bajo demanda y Universal Master Mix (Life Technologies) en un instrumento ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). El cambio en la expresión génica se calculará mediante el método del ciclo de umbral comparativo (CT) con peptidilprolil isomerasa A (*Ppia*) y *Gapdh* para la normalización. Para las matrices de genes, las muestras de cDNA se procesarán en matrices de PCR de perfilador RT2 de Fibrosis de ratón (PAMM-120C, RT2 SYBR Green/ROX qPCR Master Mix; SABiosciences) utilizando el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Los cambios en la expresión génica en la matriz se calcularán mediante el método CT comparativo utilizando el software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems/Life Technologies). Entre los cinco genes domésticos incluidos en Mouse Fibrosis RT2 Profiler PCR Array, la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*Hprt*) y *Gapdh* tienen la expresión más estable según 55 las puntuaciones de estabilidad calculadas por el software DataAssist v3.0. La media de los genes de control endógenos elegidos se utilizará como factor de normalización para calcular la expresión relativa de cada gen. Para confirmar los resultados obtenidos mediante el uso de la matriz de fibrosis, se realizarán ensayos de expresión de genes TaqMan para una selección de genes determinados por la matriz como regulados al alza, regulados a la baja o sin cambios.

**60 Ejemplo 9: Ensayo clínico**

65 Se realizó un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, de grupos paralelos y aleatorizado en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica no cirrótica para evaluar el tratamiento con ácido obetícolico administrado por vía oral (25 mg al día) o placebo durante 72 semanas. Los pacientes fueron asignados al azar 1:1 utilizando un procedimiento administrado centralmente generado por computadora, estratificado por centro clínico y estado de diabetes. La medida de resultado primaria fue la mejora en la histología hepática puntuada centralmente definida como una

disminución en la puntuación de actividad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en al menos 2 puntos sin empeoramiento de la fibrosis desde el inicio hasta el final del tratamiento. Se midió el cambio en la alanina aminotransferasa a las 24 semanas: cambio relativo en la alanina aminotransferasa -24 %, IC del 95 %: -45 a -3.

5 *Diseño del estudio y participantes*

Los pacientes se inscribieron en el estudio de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión: 18 años o más en el momento de la selección, evidencia histológica de esteatohepatitis no alcohólica definitiva o límítrofe basada en una biopsia hepática obtenida 90 días o menos antes de la aleatorización, y una puntuación de actividad histológica de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) de 4 o más con una puntuación de 1 o más en cada componente de la puntuación (esteatosis puntuada de 0 a 3, balonización de 0 a 2 e inflamación lobular de 0 a 3). La clasificación y la estadificación de las biopsias con fines de inscripción se llevaron a cabo en el sitio de inscripción. Los criterios de exclusión incluyen la presencia de cirrosis, otras causas de enfermedad hepática, consumo sustancial de alcohol (>20 g/día para mujeres o >30 g/día para hombres) u otras condiciones de confusión (ver más abajo).

15 *Aleatorización y enmascaramiento*

Los pacientes que cumplían con los criterios de elegibilidad fueron asignados aleatoriamente (1:1) a ácido obeticólico oral, 25 mg una vez al día, o placebo. El ácido obeticólico y el placebo se proporcionaron en comprimidos idénticos en recipientes idénticos etiquetados con números de código. Los pacientes, los investigadores, el personal del sitio clínico y los patólogos estarán enmascarados para la asignación del tratamiento.

*Procedimientos*

25 Después de la aleatorización, los pacientes regresaron para las visitas del estudio en las semanas 2, 4 y 12, y luego cada 12 semanas hasta completar el tratamiento en la semana 72 y luego 24 semanas después. Se obtuvieron muestras de sangre en estas visitas para pruebas bioquímicas de rutina y evaluación de las concentraciones de lípidos, glucosa e insulina en ayunas. El peso corporal, la altura y las circunferencias de la cintura y la cadera se midieron en la evaluación inicial y en los tiempos intermedios designados. Todos los pacientes recibieron recomendaciones estándar sobre hábitos alimenticios saludables, reducción de peso, ejercicio y el manejo de la hipertensión, la hipercolesterolemia y la diabetes cuando estaba indicado.

30 Las biopsias hepáticas iniciales y al final del tratamiento se evaluaron de forma centralizada como grupo para la puntuación de consenso de cada componente de la puntuación de actividad de NAFLD, se determinó el estadio de fibrosis y se asignó un diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica límítrofe o no Esteatohepatitis no alcohólica.

*Los criterios de inclusión y exclusión*

35 Los pacientes que cumplen con cualquiera de los siguientes criterios de exclusión no se consideraron elegibles para la inscripción: 1) Consumo significativo actual o histórico de alcohol durante un período de más de 3 meses consecutivos dentro del año anterior a la selección (el consumo significativo de alcohol se definió como más de 20 g/día en mujeres y más de 30 g/día en hombres, en promedio); 2) Incapacidad para cuantificar de manera confiable el consumo de alcohol según el juicio del investigador del sitio; 3) Uso de medicamentos históricamente asociados con NAFLD durante más de 2 semanas en el año anterior a la aleatorización; 4) Cirugía o procedimiento bariátrico previo o planeado; 5) Diabetes no controlada definida como HbA1c de 80,3 mmol/mol o superior en los 60 días anteriores a la inscripción; 6) Presencia de cirrosis en biopsia hepática, 7) Recuento de plaquetas <100 × 109/L; 8) Evidencia clínica de descompensación hepática definida por la presencia de cualquiera de las siguientes anomalías: albúmina sérica inferior a 32 g/L, INR superior a 1,3, bilirrubina directa superior a 22,2 µmol/L o antecedentes de várices esofágicas, ascitis, o encefalopatía hepática; 9) Evidencia de otras formas de enfermedad hepática crónica: hepatitis B definida por la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), hepatitis C definida por la presencia del ARN del virus de la hepatitis C (VHC) o anticuerpos positivos contra la hepatitis C (anti-VHC), evidencia de enfermedad hepática autoinmune en curso definida por histología hepática compatible, cirrosis biliar primaria definida por la presencia de al menos 2 criterios (evidencia bioquímica de colestasis basada principalmente en la elevación de la fosfatasa alcalina, presencia de anticuerpos antimitocondriales [AMA] y evidencia histológica de colangitis destructiva no supurativa y destrucción de los conductos biliares interlobulillares), colangitis esclerosante primaria, enfermedad de Wilson definida por ceruloplasmina por debajo de los límites de la histología hepática normal y compatible, deficiencia de alfa-1-antitripsina (A1AT) definida por características diagnósticas en el hígado histología (confirmado por un nivel de antitripsina alfa-1 inferior a lo normal, exclusión a discreción del investigador del centro), antecedentes de hemo cromatosis o sobrecarga de hierro según se define por la presencia de hierro teñible 3 o 4 en la biopsia hepática, enfermedad hepática inducida por fármacos según se define sobre la base de la exposición típica y los antecedentes, obstrucción conocida del conducto biliar, cáncer de hígado sospechado o comprobado, o cualquier otro tipo de enfermedad hepática distinta de NASH; 10) alanina aminotransferasa sérica (ALT) superior a 300 U/L; 11) Creatinina sérica de 176,8 µmol/L o mayor; 12) Incapacidad para obtener una biopsia de hígado de manera segura; 13) Historia de derivación biliar; 14) Positividad conocida para la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH); 15) Enfermedad médica grave y activa con una expectativa de vida probable de menos de 5 años; 16) Abuso de sustancias activas, incluidas las drogas inhaladas o inyectadas en el año anterior a la evaluación;

17) Embarazo, embarazo planificado, posibilidad de embarazo y falta de voluntad para usar un método anticonceptivo eficaz durante el ensayo o lactancia; 18) Participación en un ensayo IND en los 30 días anteriores a la aleatorización; 19) Cualquier otra condición que, a juicio del investigador del sitio, impida el cumplimiento o dificulte la realización del estudio; o 20) Falta de consentimiento informado.

5

#### *Análisis estadístico*

El resultado primario y los resultados secundarios binarios se analizaron mediante la prueba de Mantel-Haenszel; los resultados secundarios continuos se analizaron mediante modelos ANCOVA que relacionan el cambio en el resultado continuo desde el inicio hasta las 72 semanas con el grupo de tratamiento y con el valor inicial del resultado. Los análisis estadísticos se realizaron con SAS (SAS Institute 2011, Base SAS 9.3 Procedures Guide) y Stata (StataCorp 2013, Stata Statistical Software: versión 13).

#### *Resultados*

15

La medida de resultado primaria fue la mejoría en la histología hepática puntuada centralmente definida como una disminución en la puntuación de actividad de NAFLD en al menos 2 puntos sin empeoramiento de la fibrosis desde el inicio hasta el final del tratamiento. El empeoramiento de la fibrosis se definió como cualquier aumento numérico en el estadio. Los resultados histológicos secundarios incluyen la resolución de la esteatohepatitis no alcohólica, el cambio en la puntuación de actividad de NAFLD y los cambios en las puntuaciones individuales de balonización hepatocelular, esteatosis, inflamación lobulillar y portal y fibrosis. La mejoría en la fibrosis se definió como cualquier disminución numérica en el estadio. Los estadios de fibrosis 1a, 1b y 1c se consideraron estadio 1 a efectos del análisis. Otros resultados secundarios incluyen cambios desde el inicio hasta las 72 semanas en las concentraciones séricas de aminotransferasa y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, modelo de homeostasis en ayunas para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR por sus siglas en inglés), medidas antropométricas (peso, índice de masa corporal, relación cintura-cadera, circunferencia) y puntuaciones de calidad de vida relacionada con la salud.

#### **Ejemplo 10: Análisis de los datos**

30 Se realizó un subanálisis de los datos obtenidos en el Ejemplo 9 para evaluar el efecto de las estatinas sobre los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). Los objetivos de estos análisis secundarios fueron determinar el efecto de OCA frente a placebo en el subgrupo de pacientes con NASH más grave y evaluar los efectos del uso concomitante de estatinas sobre el colesterol LDL sérico. Los datos de los sujetos se evaluaron en tres grupos de la siguiente manera:

35

- El grupo A (n=64, sin estatina) incluyó sujetos en el brazo de tratamiento con ácido obetíólico (OCA) que no tomaban una estatina al inicio (Día 0) y que no iniciaron una estatina durante el curso del estudio hasta e incluyendo Semana 72.
- El grupo B (n=47, estatina inicial) incluyó sujetos en el grupo de tratamiento con OCA que tomaban una estatina al inicio y que continuaron con estatina durante el estudio hasta la semana 72 inclusive.
- El grupo C (n = 23, estatina nueva) incluyó sujetos en el brazo de tratamiento con OCA que no tomaban una estatina al inicio pero que iniciaron el tratamiento con estatina en un momento posterior al inicio hasta la semana 72 inclusive.

Los siguientes cálculos se realizaron para sujetos tratados con OCA en los Grupos A, B y C.

45

- Las características medias y medianas que se enumeran a continuación se evaluarán al inicio y en la semana 72.

- Valores de laboratorio: LDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), alanina y aspartato aminotransferasa, gamma glutamil transferasa
- Edad
- Género: porcentaje masculino, porcentaje femenino
- Porcentaje diabético
- Histología: esteatosis, balonización, inflamación, fibrosis

55

- Se evaluará el cambio porcentual medio y mediano en la semana 72 desde el inicio de las características anteriores.

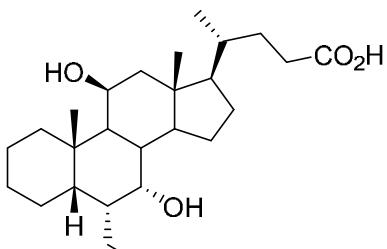
#### *Resultados*

60

El colesterol LDL aumentó durante el tratamiento con OCA en pacientes que tomaban estatinas al inicio del estudio, pero los niveles no excedieron los de los pacientes tratados con placebo que no tomaban estatinas. El inicio de estatinas durante el tratamiento con OCA revirtió el LDL a por debajo de los niveles de referencia previos a la OCA. Como se muestra en la Figura 8, el aumento de LDL relacionado con OCA pareció revertirse al iniciar la terapia con estatinas durante el tratamiento con OCA.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un agonista de FXR, al menos un fibrato y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por FXR que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita, donde el agonista de FXR es el compuesto de fórmula (1):



(1),

10

o una sal farmacéuticamente aceptable o un conjugado de aminoácidos del mismo, donde la composición farmacéutica no comprende ningún agente terapéutico distinto del agonista de FXR y el al menos un fibrato; y donde la enfermedad o condición mediada por FXR se selecciona de:

- (a) cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hipertensión portal, diarrea por ácidos biliares, enfermedad hepática crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad del hígado alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, fibrosis hepática, una enfermedad cardiovascular e hiperlipidemia; o  
 (b) una enfermedad hepática colestásica seleccionada de cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria, atresia biliar y colestasis intrahepática del embarazo.

20

2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, donde el al menos un fibrato se selecciona de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, clofibrato y una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

3. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 2, donde el fibrato es bezafibrato.

25

4. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agonista de FXR es un ácido libre del compuesto de fórmula (1).

5. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agonista de FXR es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (1).

6. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agonista de FXR es un conjugado de glicina del compuesto de fórmula (1).

35

7. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agonista de FXR es un conjugado de taurina del compuesto de fórmula (1).

40

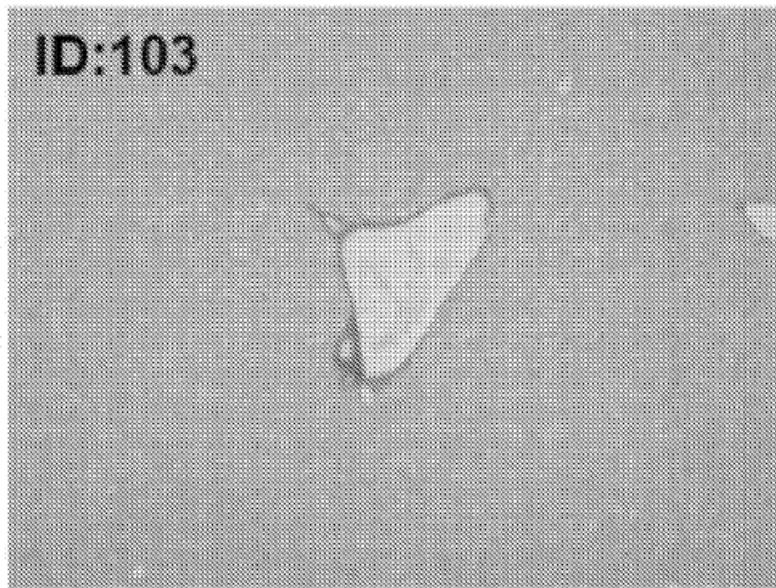
8. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la enfermedad o condición mediada por FXR se selecciona de cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), hipertensión portal, diarrea por ácidos biliares, una enfermedad crónica del hígado, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección por hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica, daño hepático debido a fibrosis progresiva, fibrosis hepática, enfermedad cardiovascular e hiperlipidemia.

45

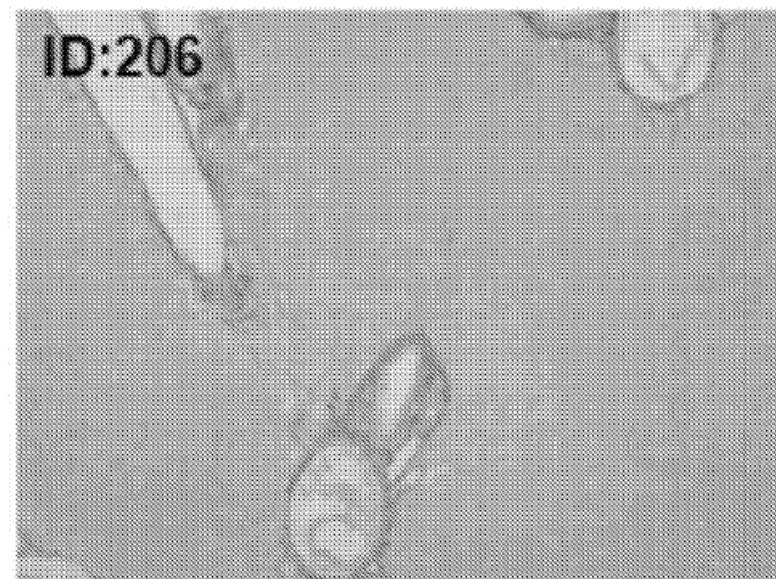
9. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la enfermedad o condición mediada por FXR es una enfermedad hepática colestásica seleccionada de cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), colestasis inducida por fármacos, colestasis hereditaria, atresia biliar y colestasis intrahepática del embarazo.

10. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, donde la enfermedad hepática colestásica es PBC.

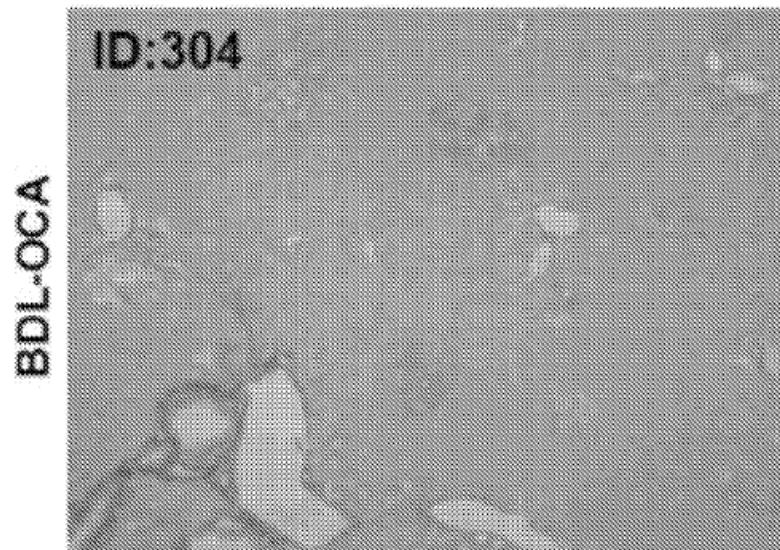
Simulación  
BDL-Vehículo



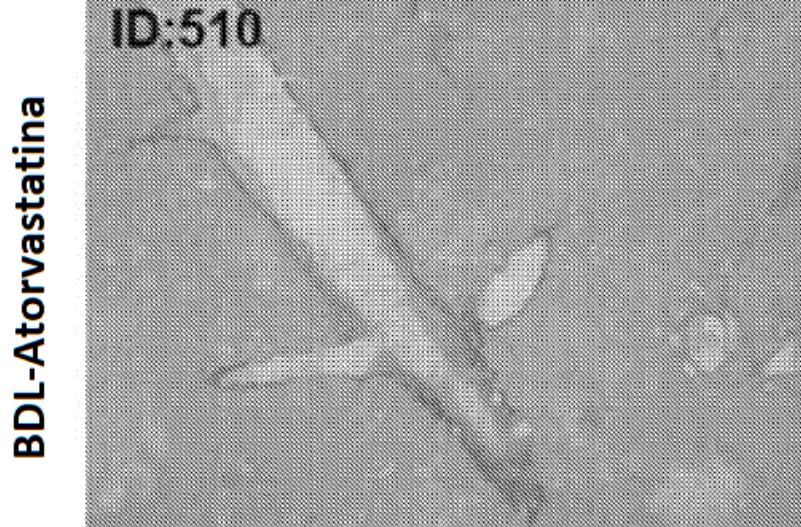
**Figura 1A**



**Figura 1C**

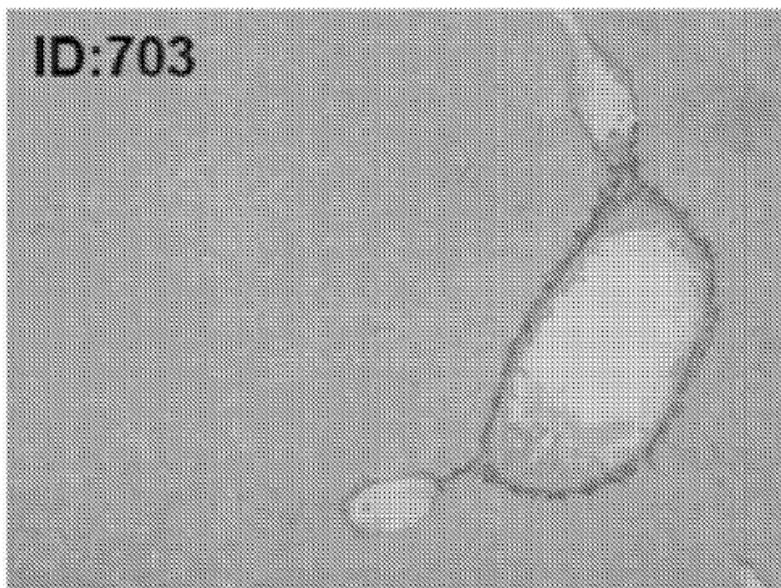


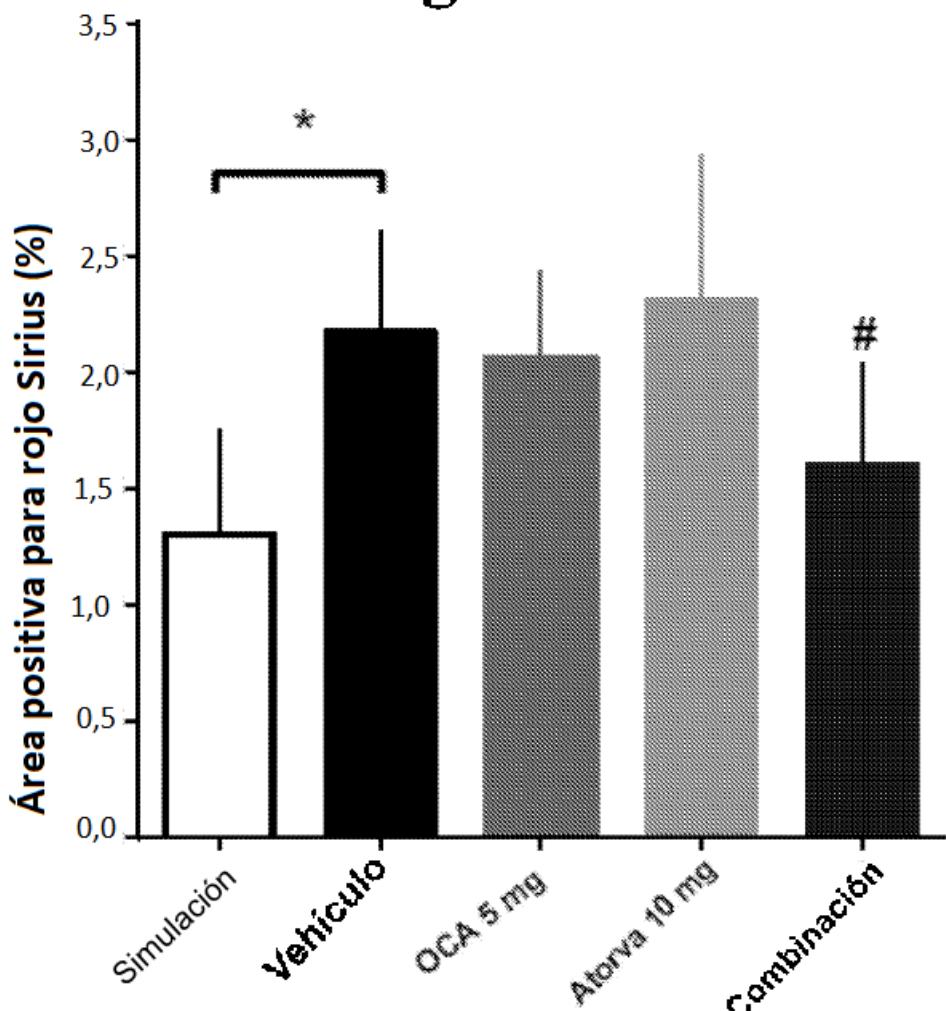
**Figura 1D**



**Figura 1E**

**BDL-OCA+Atorvastatina**

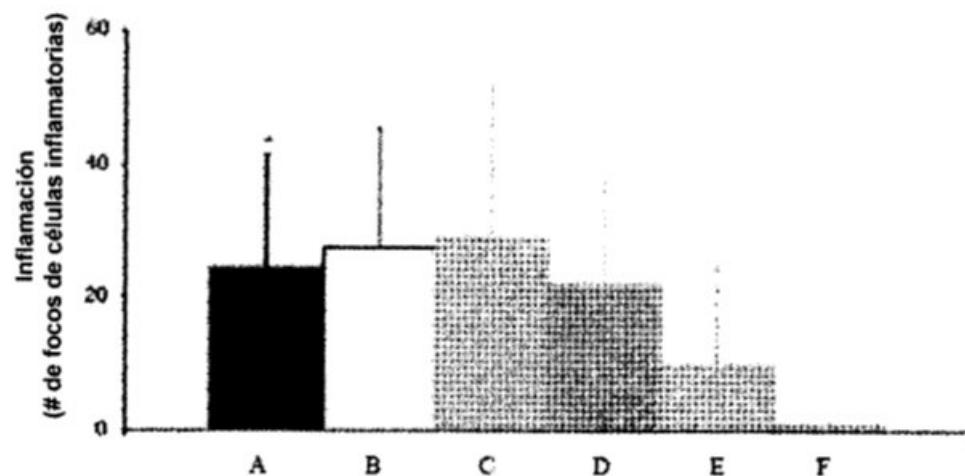


**Figura 2**

\* $p < 0,5$  respecto a control de cirugía simulada

# $p < 0,05$  respecto a control BDL con vehículo

**Figura 3A**



Columna A: grupo de referencia HFC

\* p<0,05 respecto a control

Columna B: grupo control HFC

\* p<0,05 respecto a OCA

Columna C: OCA

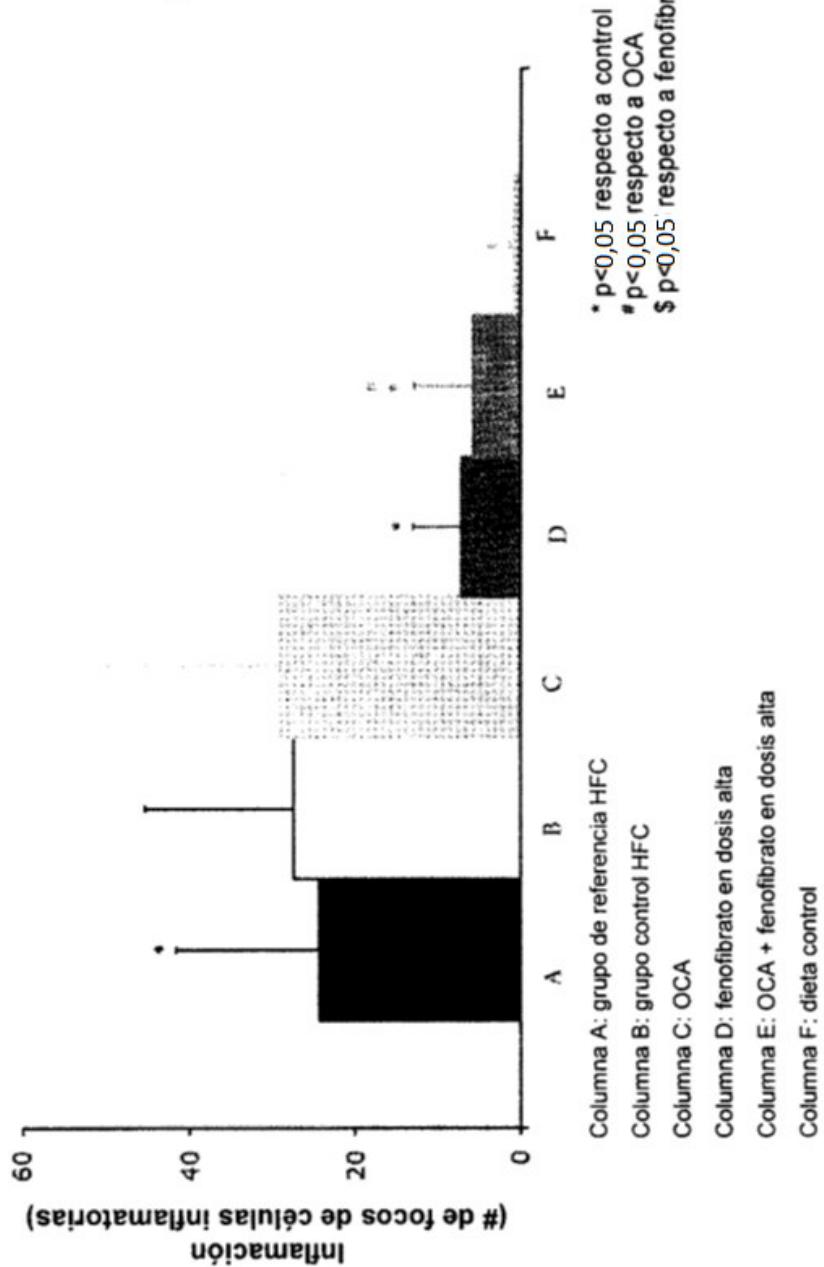
\$ p<0,05 respecto a fenofibrato

Columna D: fenofibrato en dosis baja

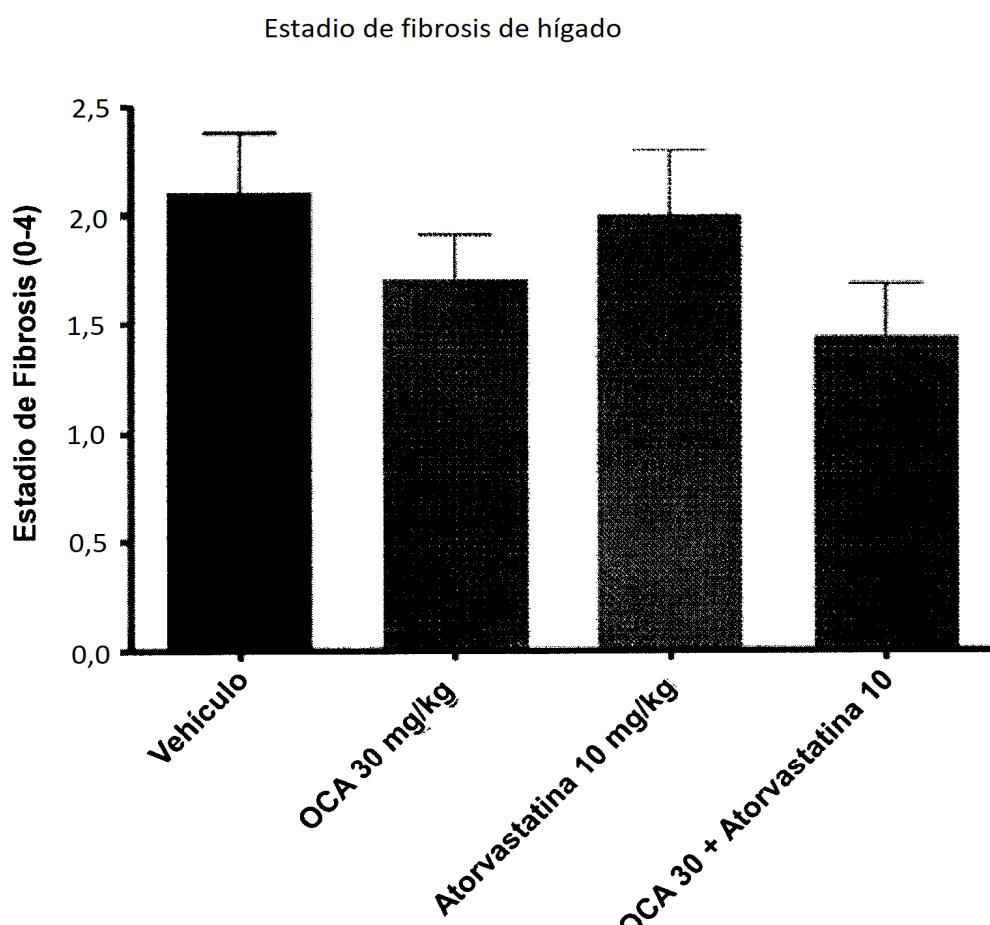
Columna E: OCA + fenofibrato en dosis baja

Columna F: dieta control

Figura 3B

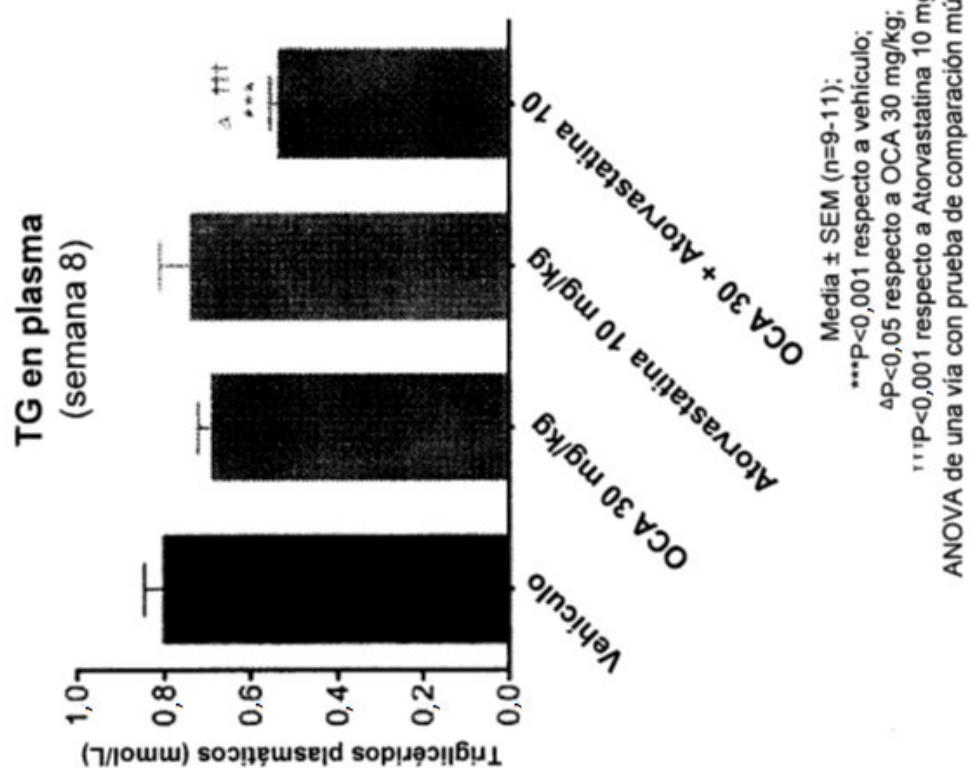


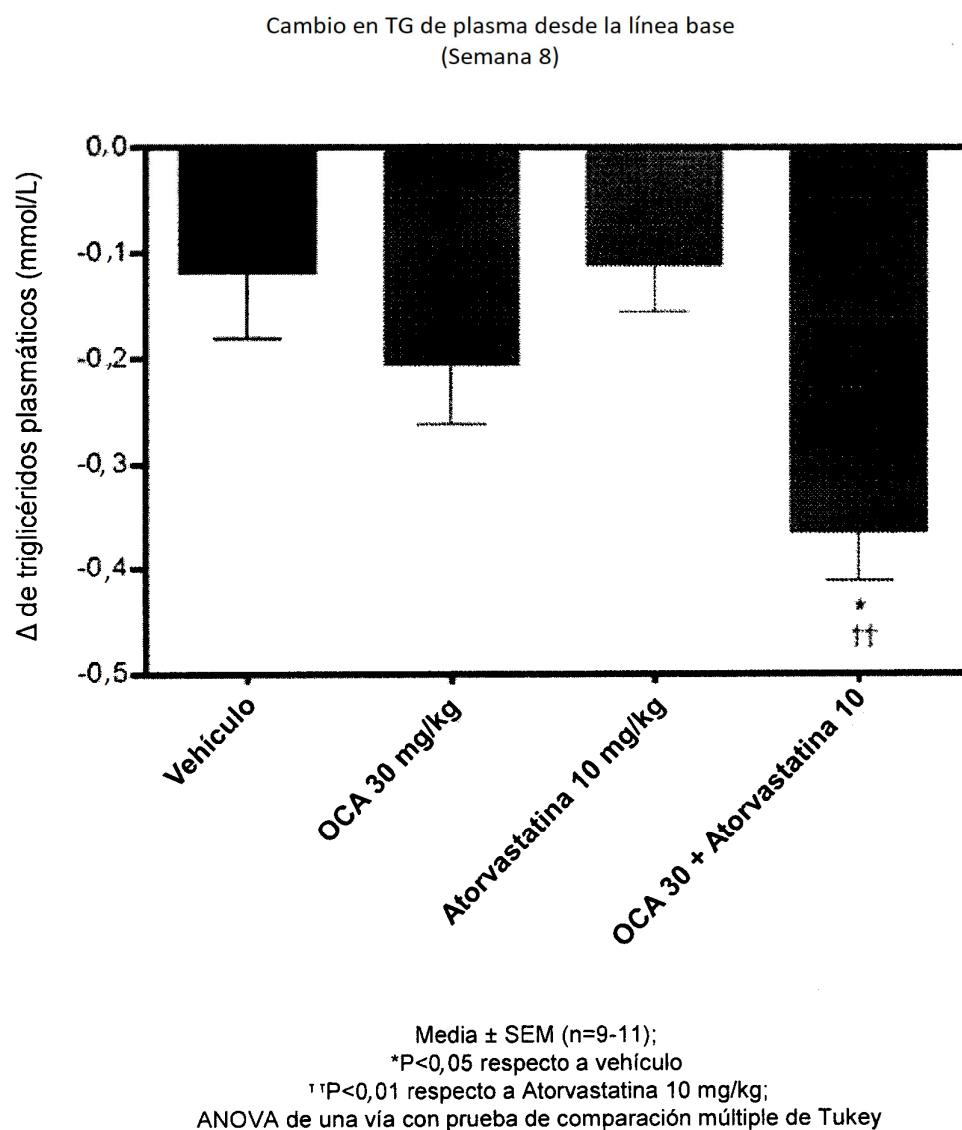
**Figura 4**

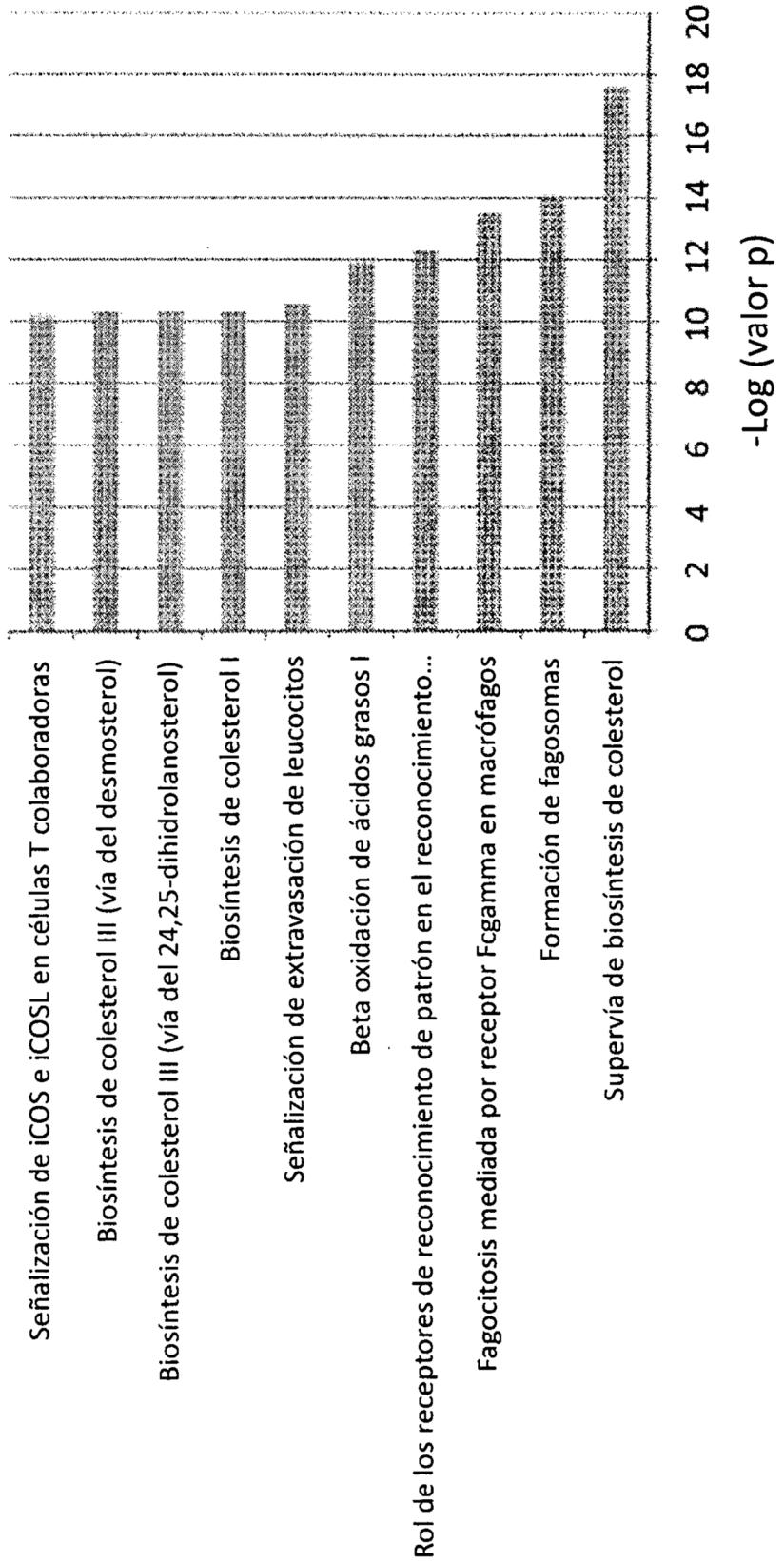


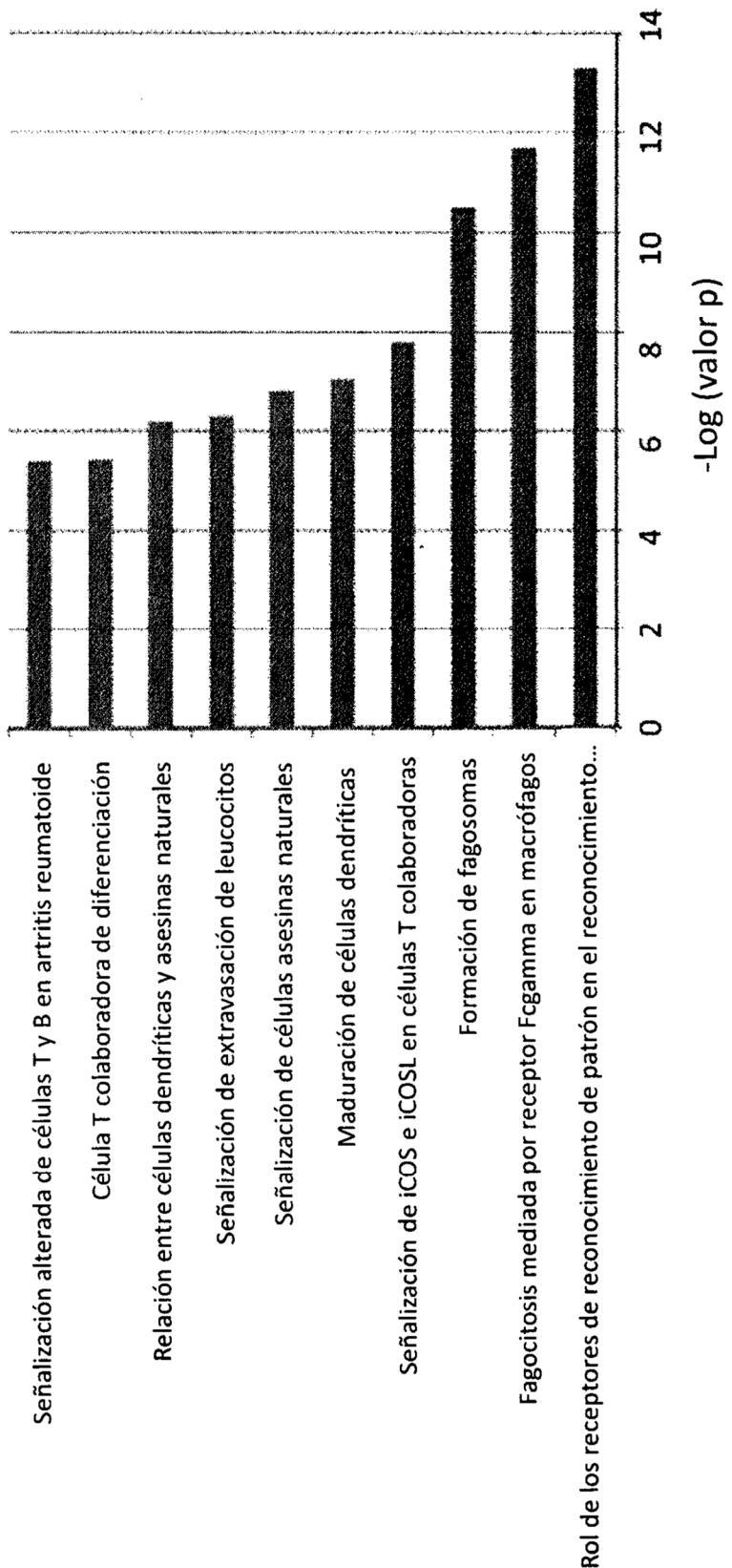
Media  $\pm$  SEM (n=9-11);  
NS: ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple de Tukey

Figura 5A



**Figura 5B**

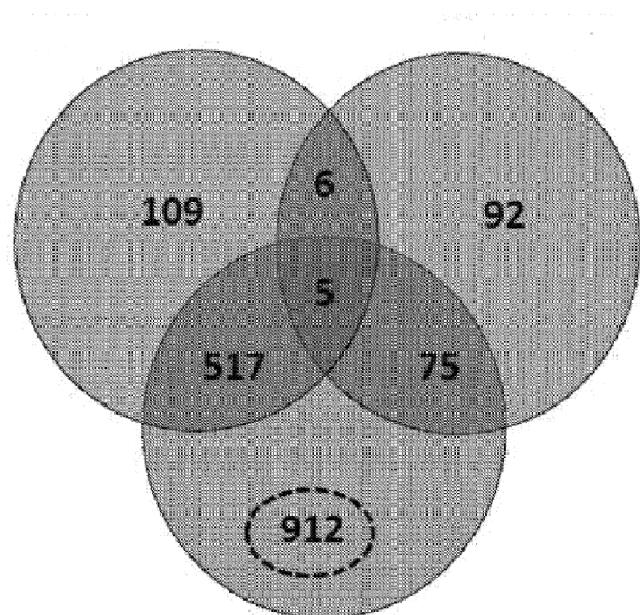
**Figura 6A**

**Figura 6B**

**Figura 7A**

**OCA versus Vehículo**

**Fenofibrato versus Vehículo**



**Combinación versus Vehículo**

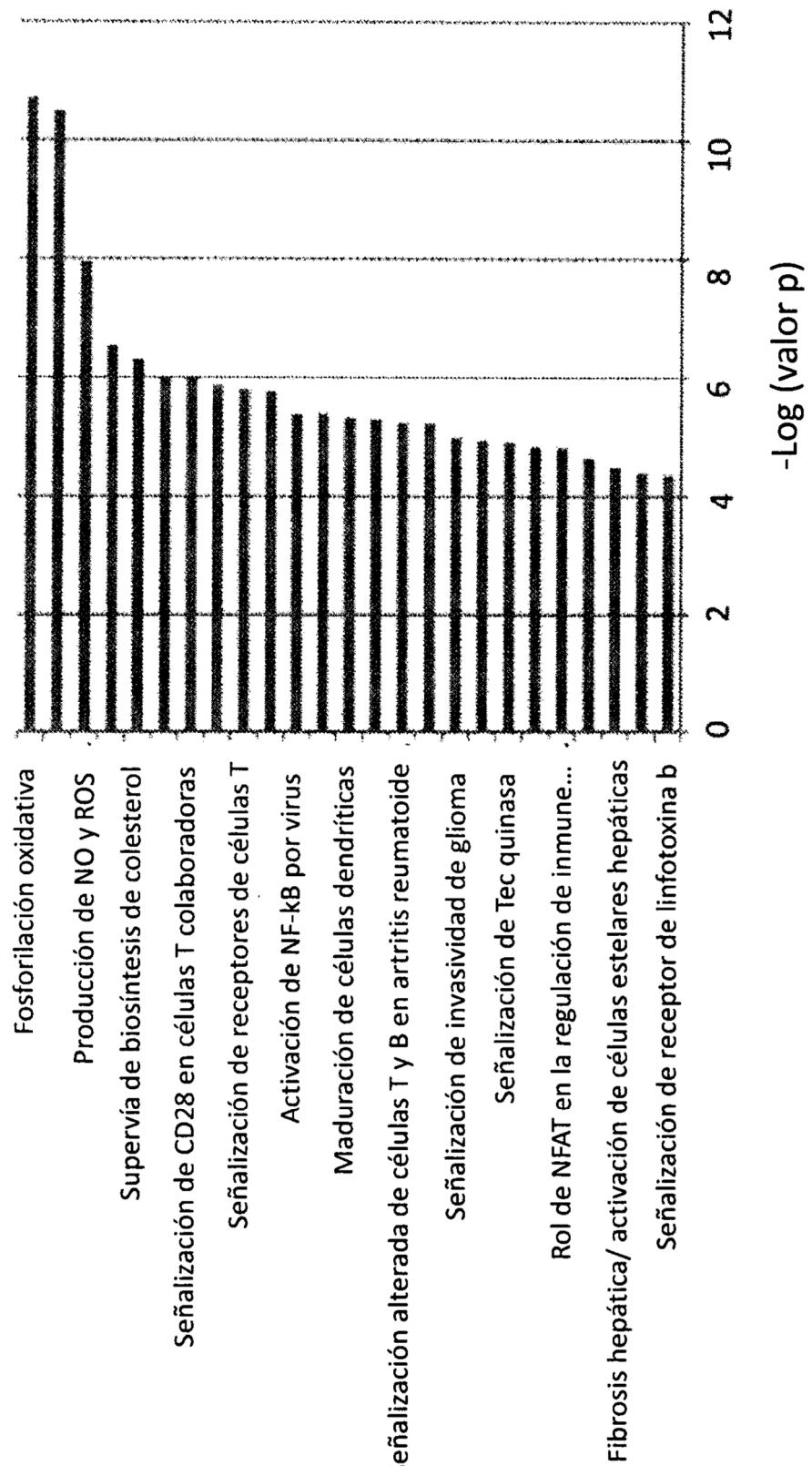
**Figura 7B**

Figura 8

