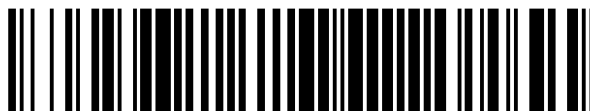


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 777**

51 Int. Cl.:

<b>A61P 5/00</b>	(2006.01)
<b>C07D 281/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/554</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2021 PCT/EP2021/071618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2022 WO22029101**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2021 E 21762364 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 4188541**

54 Título: **Compuestos de benzoti(di)azepina y su uso como moduladores de los ácidos biliares**

30 Prioridad:

**03.08.2020 IN 202011033169**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.03.2025**

73 Titular/es:

**ALBIREO AB (100.00%)  
Arvid Wallgrens Backe 20  
413 46 Göteborg, SE**

72 Inventor/es:

**GILLBERG, PER-GÖRAN;  
STARKE, INGEMAR y  
KULKARNI, SANTOSH S.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 002 777 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

Compuestos de benzoti(di)azepina y su uso como moduladores de los ácidos biliares

## 5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a ciertos derivados de 1,5-benzotiazepina y 1,2,5-benzotiadiazepina tal como se definen en el presente documento. Estos compuestos son moduladores de ácidos biliares que tienen actividad inhibidora del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT) y/o del transporte hepático de ácidos biliares (LBAT). La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y al uso de estos compuestos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, trastornos del metabolismo de los ácidos grasos y de la utilización de la glucosa, enfermedades gastrointestinales y enfermedades hepáticas.

## 15 FONDO

Los ácidos biliares son detergentes fisiológicos que desempeñan un papel importante en la absorción intestinal y el transporte de lípidos, nutrientes y vitaminas. También son moléculas señalizadoras que activan los receptores nucleares y las vías de señalización celular que regulan el metabolismo de los lípidos, la glucosa y la energía. Los ácidos biliares son ácidos esteroideos que se sintetizan a partir del colesterol en el hígado y se almacenan en la vesícula biliar en forma de micelas mixtas. Durante la digestión, el duodeno desencadena la liberación de hormonas que provocan la contracción de la vesícula biliar, liberando así ácidos biliares en el intestino delgado, donde permiten la absorción de vitaminas liposolubles y colesterol. Cuando llegan al íleon, los ácidos biliares se reabsorben del intestino y se secretan en la sangre portal para volver al hígado a través de la circulación venosa portal. De este modo, más del 90% de los ácidos biliares se reciclan y vuelven al hígado. A continuación, estos ácidos biliares se transportan a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos y se vuelven a segregar a través de la membrana canalicular en la bilis. En este primer paso, el 75-90% de los ácidos biliares son absorbidos por los hepatocitos, completando así una vuelta de la circulación enterohepática. La fracción de ácidos biliares que no se elimina en el hígado entra en la circulación sistémica, donde los ácidos biliares libres son filtrados por el glomérulo renal, recuperados eficazmente en los túbulos proximales y exportados de nuevo a la circulación sistémica. Curiosamente, la mayor parte de los ácidos biliares secretados a través de la membrana canalicular hacia la bilis proceden del pool recirculante y menos del 10% proviene de una nueva síntesis hepática de novo. La pequeña fracción de ácidos biliares que no se reabsorbe en el íleon llega al colon. Dentro de la luz intestinal, los ácidos biliares primarios se transforman en ácidos biliares secundarios bajo la acción de las bacterias intestinales, principalmente mediante reacciones de deshdroxilación simple o doble del núcleo esteroide. Los ácidos biliares que escapan a la absorción intestinal se excretan posteriormente en las heces.

En general, el eficaz sistema de transporte ayuda a mantener una reserva constante de ácidos biliares, garantizando niveles suficientemente elevados de ácidos biliares conjugados en el intestino para favorecer la absorción de lípidos y reducir la carga bacteriana del intestino delgado. El sistema también minimiza la pérdida fecal y urinaria de ácidos biliares y protege los compartimentos intestinal y hepatobiliar eliminando detergentes potencialmente citotóxicos (como revisaron Kosters y Karpen (*Xenobiotica* 2008, vol. 38, p. 1043-1071); por Chiang (*J. Lipid Res.* 2009, vol. 50, p. 1955-1966); y por Dawson (*Handb. Exp. Pharmacol.* 2011, vol. 201, p. 169-203)).

Se ha descubierto que la regulación del tamaño de la reserva de ácidos biliares desempeña un papel clave en la homeostasis del colesterol mediante la conversión hepática del colesterol en ácido biliar, que representa una vía importante para la eliminación del colesterol del organismo. El hígado desempeña un papel esencial en la eliminación de compuestos endógenos y xenobióticos del organismo. La secreción hepatobiliar y la circulación enterohepática normales son necesarias para eliminar del organismo compuestos endógenos como el colesterol y la bilirrubina y sus metabolitos, manteniendo así la homeostasis de los lípidos y los ácidos biliares. (Kosters and Karpen, *Xenobiotica* 2008, vol. 38, p. 1043-1071).

La reabsorción de ácidos biliares en el íleon puede inhibirse mediante compuestos inhibidores del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT). La inhibición de la reabsorción de ácidos biliares se ha considerado útil en el tratamiento de varias enfermedades, como la dislipidemia, la diabetes, la obesidad, el estreñimiento, las hepatopatías colestásicas, la esteatohepatitis no alcohólica y otras enfermedades hepáticas. En las últimas décadas se han dado a conocer varios compuestos inhibidores de ASBT, véase, p. ej., WO 93/16055, WO 94/18183, WO 94/18184, WO 96/05188, WO 96/08484, WO 96/16051, WO 97/33882, WO 98/03818, WO 98/07449, WO 98/40375, WO 99/35135, WO 99/64409, WO 99/64410, WO 00/47568, WO 00/61568, WO 00/38725, WO 00/38726, WO 00/38727, WO 00/38728, WO 00/38729, WO 01/66533, WO 01/68096, WO 02/32428, WO 02/50051, WO 03/020710, WO 03/022286, WO 03/022825, WO 03/022830, WO 03/061663, WO 03/091232, WO 03/106482, WO 2004/006899, WO 2004/076430, WO 2007/009655, WO 2007/009656, WO 2011/137135, WO 2019/234077, WO 2020/161216, WO 2020/161217, WO 2021/110883, WO 2021/110884, WO 2021/110885, WO 2021/110886, WO 2021/110887, DE 19825804, EP 864582, EP 489423, EP 549967, EP 573848, EP 624593, EP 624594, EP 624595, EP 624596, EP 0864582, EP 1173205, EP 1535913 y EP 3210977.

Los documentos US 2019/0367467 y WO 2019/234077 divulgan derivados de 1,5-benzotiazepina y 1,2,5-benzotiadiazepina que tienen una insaturación en la cadena en la posición 8 de la estructura de benzoti(di)azepina.

A pesar del número de compuestos inhibidores de ASBT de los que se ha informado previamente, existe la necesidad de compuestos moduladores de ácidos biliares adicionales que tengan un perfil optimizado con respecto a la potencia, selectividad y biodisponibilidad.

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto que ciertos derivados de benzotiazepina y benzotiadiazepina son potentes inhibidores del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT) y/o del transportador hepático de ácidos biliares (LBAT), y pueden ser útiles para tratar enfermedades en las que es deseable la inhibición de la circulación de ácidos biliares.

En un primer aspecto, por lo tanto, la invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- Ácido (S)-3-(((S)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;
- Ácido (S)-3-(((R)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;
- Ácido (R)-3-(((S)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;
- Ácido (R)-3-(((R)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;
- Ácido 1-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;
- Ácido (S)-1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;
- Ácido (R)-1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;
- Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;
- Ácido (S)-3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;
- Ácido (R)-3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;
- Ácido 3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico;
- Ácido (S)-3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico; ácido (R)-3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico;
- Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;
- Ácido 3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;
- Ácido (S)-3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;
- Ácido (R)-3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;
- Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoico;
- Ácido 3-((3,3-dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoico;
- Ácido 3-((3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico; y
- Ácido 2-hidroxi-3-((7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)propanoico;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tal como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son adecuados para el uso farmacéutico humano y que son generalmente seguros, no tóxicos y ni biológicamente ni de otro modo indeseables.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor o parámetro que incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente 20" incluye la descripción de "20". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En general, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (p. ej., dentro del intervalo de confianza del 95% para la media) o dentro del 10% del valor indicado, el que sea mayor.

Los compuestos de 1,5-benzotiazepina y 1,2,5-benzotiadiazepina de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, son inhibidores del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (inhibidores ASBT), del transportador hepático de ácidos biliares (inhibidores LBAT), o tanto del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio como del transportador hepático de ácidos biliares (inhibidores duales ASBT/LBAT). Por lo tanto, son útiles en el tratamiento o la prevención de afecciones, trastornos y enfermedades en los que es deseable inhibir la circulación de ácidos biliares, como enfermedades cardiovasculares, trastornos del metabolismo de los ácidos grasos y de la utilización de la glucosa, enfermedades gastrointestinales y enfermedades hepáticas.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen, entre otras, la hipercolesterolemia; la diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2; cataratas, enfermedades micro y macrovasculares, retinopatía, neuropatía, nefropatía y retraso en la cicatrización de heridas, isquemia tisular, pie diabético, arteriosclerosis, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, angina de pecho inestable, angina de pecho estable, accidente cerebrovascular, enfermedad oclusiva arterial periférica, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, trastornos del ritmo cardíaco y reestenosis vascular; resistencia a la insulina (alteración de la homeostasis de la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, niveles sanguíneos elevados de ácidos grasos o glicerol, obesidad, dislipidemia, hiperlipidemia, incluida la hipertrigliceridemia, síndrome metabólico (síndrome X), aterosclerosis e hipertensión; y para aumentar los niveles de lipoproteínas de alta densidad.

Las enfermedades y los trastornos gastrointestinales incluyen el estreñimiento (estreñimiento crónico, estreñimiento funcional, estreñimiento idiopático crónico (CIC), estreñimiento intermitente/espórado, estreñimiento secundario a la diabetes mellitus, estreñimiento secundario a un accidente cerebrovascular, estreñimiento secundario a una enfermedad renal crónica, estreñimiento secundario a la esclerosis múltiple, estreñimiento secundario a la enfermedad de Parkinson, estreñimiento secundario a la esclerosis sistémica, estreñimiento inducido por fármacos, síndrome del intestino irritable con estreñimiento (IBS-C), síndrome del intestino irritable mixto (IBS-M), estreñimiento funcional pediátrico y estreñimiento inducido por opiáceos); enfermedad de Crohn; malabsorción primaria de ácidos biliares; síndrome del intestino irritable (IBS); enfermedad inflamatoria intestinal (IBD); inflamación ileal; y enfermedad por reflujo y sus complicaciones, como el esófago de Barrett, la esofagitis por reflujo biliar y la gastritis por reflujo biliar.

Una enfermedad hepática, tal como se define en el presente documento, es cualquier enfermedad del hígado y de los órganos relacionados con él, como el páncreas, la vena porta, el parénquima hepático, el árbol biliar intrahepático, el árbol biliar extrahepático y la vesícula biliar. En algunos casos, se trata de una enfermedad hepática dependiente de los ácidos biliares. Las enfermedades y trastornos hepáticos incluyen, entre otros, un trastorno metabólico hereditario del hígado; errores congénitos de la síntesis de ácidos biliares; anomalías congénitas de las vías biliares; atresia biliar; atresia biliar post-Kasai; atresia biliar posttrasplante de hígado; hepatitis neonatal; colestasis neonatal; formas hereditarias de colestasis; xantomatosis cerebrotendinosa; un defecto secundario de la síntesis de BA; síndrome de Zellweger; enfermedad hepática asociada a la fibrosis quística; deficiencia de alfa1-antitripsina; síndrome de Alagilles (ALGS); síndrome de Byler; un defecto primario de la síntesis de ácidos biliares (BA); colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC), incluidas PFIC-1, PFIC-2, PFIC-3 y PFIC no especificada, PFIC post-desvío biliar y PFIC post-trasplante hepático; colestasis intrahepática recurrente benigna (BRIC), incluidas BRIC2, LCS1 y BRIC no especificada, BRIC post-desvío biliar y BRIC post-trasplante hepático; hepatitis autoinmune; cirrosis biliar primaria (PBC); fibrosis hepática; enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); hipertensión portal; colestasis; colestasis del síndrome de Down; colestasis inducida por fármacos; colestasis intrahepática del embarazo (ictericia durante el embarazo); colestasis intrahepática; colestasis extrahepática; colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC); colestasis asociada a bajo contenido en fosfolípidos; síndrome de colestasis linfedematosa 1 (G4); colangitis esclerosante primaria (PSC); colangitis asociada a inmunoglobulina G4; colangitis biliar primaria; colelitiasis (cálculos biliares); litiasis biliar; coledocolitiasis; pancreatitis por cálculos biliares; enfermedad de Caroli; neoplasia maligna de las vías biliares; neoplasia maligna que causa obstrucción del árbol biliar; estenosis biliar; colangiopatía por AIDS; colangiopatía isquémica; prurito debido a colestasis o ictericia; pancreatitis; enfermedad hepática autoinmune crónica que provoca colestasis progresiva; esteatosis hepática; hepatitis alcohólica; hígado graso agudo; hígado graso del embarazo; Hepatitis inducida por fármacos; trastornos por sobrecarga de hierro; defecto congénito de la síntesis de ácidos biliares tipo 1 (defecto BAS tipo 1); lesión hepática inducida por fármacos (DILI); fibrosis hepática; fibrosis hepática congénita; cirrosis hepática; histiocitosis de células de Langerhans (LCH); colangitis esclerosante por ictiosis neonatal (NISCH); protoporfiria eritropoyética (EPP); ductopenia idiopática del adulto (IAD); hepatitis neonatal idiopática (INH); insuficiencia no sindrómica de los conductos biliares interlobulares (NS PILBD); cirrosis infantil de los indios norteamericanos (NAIC); sarcoidosis hepática; amiloidosis; enterocolitis necrotizante; toxicidades causadas por ácidos biliares séricos, incluidas alteraciones del ritmo cardíaco (por ej.g., fibrilación auricular) en el contexto de un perfil anormal de ácidos biliares séricos, cardiomiopatía asociada a cirrosis hepática ("coleicardia") y atrofia muscular esquelética asociada a hepatopatía colestásica; hepatopatía poliúística; hepatitis vírica (incluidas hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E); carcinoma hepatocelular (hepatoma); colangiocarcinoma; cánceres gastrointestinales relacionados con los ácidos biliares; y colestasis causada por tumores y neoplasias del hígado, del tracto biliar y del páncreas. Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, también son útiles para mejorar el tratamiento con corticosteroides en las enfermedades hepáticas.

Otras enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyen abetalipoproteinemia; hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL); enfermedad de retención de quilomicrones; sitosterolemia; hipervitaminosis y osteopetrosis; hipertensión; hiperfiltración glomerular; poliquistosis renal (PKD), incluida la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) y la poliquistosis renal

autosómica recesiva (ARPKD); y prurito de insuficiencia renal; Los compuestos también son útiles en la protección contra lesiones renales asociadas a enfermedades hepáticas o metabólicas.

El transporte de ácidos biliares en el cuerpo humano está controlado por la acción de los miembros de la familia SLC10 de proteínas transportadoras de solutos, en particular por el polipéptido cotransportador de Na<sup>+</sup>-taurocolato (NTCP, también llamado transportador hepático de ácidos biliares (LBAT); símbolo genético SLC10A1), que se expresa en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, y por el transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT, también llamado transportador ileal de ácidos biliares (IBAT), ISBT, ABAT o NTCP2; símbolo genético SLC10A2), que se expresa en la membrana apical de los enterocitos ileales, las células del túbulo renal proximal, el epitelio biliar, los colangiocitos grandes y las células epiteliales de la vesícula biliar. En el hígado, los ácidos biliares son extraídos eficazmente de la sangre portal por el transportador hepático de ácidos biliares (LBAT) y vuelven a secretar a través de la membrana canalicular por la bomba de exportación de sales biliares (BSEP; símbolo genético *ABCB11*). La reabsorción de ácidos biliares en el íleon corre a cargo del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT), donde se denomina comúnmente transportador ileal de ácidos biliares (IBAT). Tanto LBAT como ASBT funcionan como cotransportadores electrogénicos de sodio-soluto que mueven dos o más iones Na<sup>+</sup> por molécula de soluto.

Los xenobióticos y endobióticos, incluidos los ácidos biliares, son absorbidos por el hígado desde la sangre portal y secretados a la bilis por proteínas transportadoras distintas con especificidades de sustrato individualizadas. Los ácidos biliares conjugados con glicina y taurina existen en forma aniónica y son incapaces de atravesar las membranas por difusión, por lo que dependen completamente de las proteínas de transporte de membrana para entrar o salir del hepatocito (Kosters y Karpen, *Xenobiotica* 2008, vol. 38, p. 1043-1071). ASBT y LBAT prefieren las sales biliares conjugadas con glicina y taurina a sus homólogas no conjugadas y demuestran una mayor afinidad por las sales biliares dihidroxi que por las sales biliares trihidroxi. Aún no se han identificado sustratos no ácidos biliares para el ASBT, sin embargo, se ha descubierto que el LBAT también transporta una variedad de sulfatos esteroideos, hormonas y xenobióticos.

El LBAT no está tan caracterizado como el ASBT en términos de requisitos de inhibición de fármacos. Dong et al. han identificado fármacos aprobados por la FDA que inhiben el LBAT humano y han comparado los requisitos de inhibición del LBAT y ASBT. Se realizaron una serie de estudios de inhibición de LBAT con fármacos aprobados por la FDA, junto con el desarrollo iterativo de modelos computacionales. Los estudios de cribado identificaron 27 fármacos como nuevos inhibidores de LBAT, entre ellos irbesartán ( $K_i = 11,9 \mu\text{M}$ ) y ezetimiba ( $K_i = 25,0 \mu\text{M}$ ). El farmacóforo de características comunes indicaba que dos hidrófobos y un aceptor de enlace de hidrógeno eran importantes para la inhibición del LBAT. De los 72 fármacos analizados in vitro, un total de 31 fármacos inhibieron el LBAT, mientras que 51 fármacos (es decir, más de la mitad) inhibieron el ASBT. Por lo tanto, aunque hubo solapamiento de inhibidores, el ASBT fue inesperadamente más permisivo a la inhibición de fármacos que el LBAT, y esto puede estar relacionado con que el LBAT posee menos características farmacóforas (Dong et al., *Mol. Pharm.* 2013, vol. 10, p. 1008- 1019).

Vaz et al. describen la identificación de la deficiencia de LBAT como un nuevo error innato del metabolismo con un fenotipo clínico relativamente leve. La identificación de la deficiencia de LBAT confirma que este transportador es el principal sistema de importación de sales biliares conjugadas al hígado, pero también indica que los transportadores auxiliares son capaces de sostener el ciclo enterohepático en su ausencia (Vaz et al., *Hepatology* 2015, vol. 61, p. 260-267). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la inhibición del LBAT es un mecanismo de acción seguro, ya que los hepatocitos siguen teniendo la posibilidad de captar la cantidad necesaria de ácidos biliares.

Liu et al. describen la identificación de un nuevo tipo de hipercolanemia que se asocia con homocigosidad para la mutación p.Ser267Phe en *SLC10A1* (LBAT). La frecuencia alélica de esta mutación en el gen *SLC10A1* varía en las distintas poblaciones, dándose la mayor incidencia en el sur de China (8% y 12% en los chinos Han y Dai, respectivamente) y en Vietnam (11%). Se cree que esta hipercolanemia "oculta" afecta al 0,64% de la población Han del Sur, al 1,44% de la población china Dai y al 1,21% de la población vietnamita. También se observó un aumento de los niveles séricos de BA conjugada y no conjugada en los individuos homocigotos. Liu et al. sugieren que lo más probable es que este hallazgo se deba a una reducción del transporte de BA desde la circulación portal a los hepatocitos. Esto apoya la hipótesis de que la función fisiológica de la circulación enterohepática no es solo reciclar los ácidos biliares, sino también eliminarlos de la circulación para lograr la homeostasis (Karpen y Dawson, *Hepatology* 2015, vol. 61, p. 24-27). Otra posibilidad es que el hígado sintetice mayores niveles de ácidos biliares para compensar la menor recirculación enterohepática en los portadores homocigotos. Como LBAT también transporta ácidos biliares no conjugados, el aumento de los ácidos biliares no conjugados en este estudio no fue sorprendente (Liu et al., *Scientific Reports* 2017, 7: 9214, p. 1-7).

Se ha descubierto que el LBAT está regulado a la baja en varias formas de lesión hepática colestásica y colestasis, mientras que se ha descubierto que el ASBT está regulado a la baja en una variedad de trastornos gastrointestinales como la enfermedad de Crohn, la malabsorción primaria de ácidos biliares, la enfermedad inflamatoria intestinal y la inflamación ileal, pero regulada al alza en la colestasis. El LBAT también funciona como receptor celular para la entrada viral del virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis D (VHD), que a su vez es la principal causa de enfermedad hepática y carcinoma hepatocelular.

La inhibición de ASBT se ha investigado para disminuir los niveles plasmáticos de colesterol y mejorar la resistencia a la insulina, así como para aliviar la carga hepática de ácidos biliares en la enfermedad hepática colestásica. Además, se ha

descubierto que la inhibición del ASBT restablece los niveles de insulina y la normogluceemia, lo que establece la inhibición del ASBT como un tratamiento prometedor para la diabetes mellitus de tipo 2. Los inhibidores del ASBT también se utilizan para el tratamiento del estreñimiento funcional.

5 Como el ASBT se expresa predominantemente en el íleon (donde a menudo se denomina IBAT), no es necesario que los inhibidores del ASBT estén disponibles sistémicamente. Por otra parte, el ASBT también se expresa en las células del túbulo proximal de los riñones. Por lo tanto, los inhibidores del ASBT disponibles por vía sistémica también pueden inhibir la recaptación de ácidos biliares en los riñones. Se cree que esto conduciría a un aumento de los niveles de ácidos biliares en la orina y a una mayor eliminación de ácidos biliares del organismo a través de la orina. Por lo tanto, se espera que los  
10 inhibidores del ASBT disponibles sistémicamente que ejercen su efecto no sólo en el íleon sino también en los riñones produzcan una mayor reducción de los niveles de ácidos biliares que los inhibidores del ASBT no disponibles sistémicamente que sólo ejercen su efecto en el íleon.

15 Los compuestos que tienen una elevada potencia inhibidora del ASBT son especialmente adecuados para el tratamiento de enfermedades hepáticas que causan colestasis, como la colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC), el síndrome de Alagilles, la atresia biliar y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

20 La atresia biliar es una enfermedad hepática pediátrica rara que implica una obstrucción parcial o total (o incluso ausencia) de grandes conductos biliares. Esta obstrucción o ausencia provoca colestasis que conduce a la acumulación de ácidos biliares que dañan el hígado. En algunas realizaciones, la acumulación de ácidos biliares se produce en el árbol biliar extrahepático. En algunas realizaciones, la acumulación de ácidos biliares se produce en el árbol biliar intrahepático. El tratamiento estándar actual es el procedimiento Kasai, una intervención quirúrgica que extirpa los conductos biliares obstruidos y conecta directamente una porción del intestino delgado con el hígado. Actualmente no existen tratamientos farmacológicos aprobados para este trastorno.

25 Se proporciona aquí un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la atresia biliar. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido sometido al procedimiento Kasai antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, se administra al sujeto un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, antes de someterlo al procedimiento Kasai. En algunas realizaciones, el tratamiento de la atresia biliar disminuye el nivel de ácidos biliares séricos en el sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos se determina mediante, por ejemplo, un ensayo enzimático ELISA o los ensayos para la medición de ácidos biliares totales descritos en Danese et al., PLoS One. 2017, vol. 12(6): e0179200. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos puede disminuir, por ejemplo, del 10% al 40%, del 20% al 50%, del 30% al 60%, del 40% al 70%, del 50% al 80%, o en más del 90% del  
30 nivel de ácidos biliares séricos antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el tratamiento de la atresia biliar incluye el tratamiento del prurito.

35 La PFIC es un trastorno genético raro que se estima que afecta a uno de cada 100.000 a 100.000 niños nacidos en todo el mundo y causa una enfermedad hepática progresiva y potencialmente mortal.

40 Una manifestación de la PFIC es el prurito, que a menudo resulta en una calidad de vida gravemente disminuida. En algunos casos, la PFIC provoca cirrosis e insuficiencia hepática. Las terapias actuales incluyen la Derivación Biliar Externa Parcial (DEBP) y el trasplante de hígado; sin embargo, estas opciones pueden conllevar un riesgo sustancial de complicaciones posquirúrgicas, así como problemas psicológicos y sociales.

45 Se han identificado tres defectos genéticos alternativos que se correlacionan con tres subtipos distintos de PFIC conocidos como tipos 3 y 3:

50 La PFIC, tipo 1, a veces denominada "enfermedad de Byler", está causada por una secreción biliar deficiente debida a mutaciones en el gen ATP8B1, que codifica una proteína que ayuda a mantener un equilibrio adecuado de grasas conocidas como fosfolípidos en las membranas celulares de los conductos biliares. Un desequilibrio en estos fosfolípidos se asocia con colestasis y ácidos biliares elevados en el hígado. Los sujetos afectados por PFIC, tipo 1 suelen desarrollar colestasis en los primeros meses de vida y, en ausencia de tratamiento quirúrgico, progresan a cirrosis y hepatopatía terminal antes de finalizar la primera década de vida.

55 La PFIC tipo 2, a veces denominada "síndrome de Byler", está causada por un deterioro de la secreción de sales biliares debido a mutaciones en el gen ABCB11, que codifica una proteína, conocida como bomba de exportación de sales biliares, que desplaza los ácidos biliares fuera del hígado. Los sujetos con PFIC, tipo 2 suelen desarrollar insuficiencia hepática en los primeros años de vida y tienen un mayor riesgo de desarrollar un tipo de cáncer de hígado conocido como carcinoma hepatocelular.

60 La PFIC tipo 3, que suele presentarse en los primeros años de la infancia con colestasis progresiva, está causada por mutaciones en el gen ABCB4, que codifica un transportador que desplaza los fosfolípidos a través de las membranas celulares.

65 Además, se ha propuesto que las mutaciones de los genes TJP2, NR1H4 o Myo5b son causas de la PFIC. Además,

algunos sujetos con PFIC no presentan una mutación en ninguno de los genes ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, NR1H4 o Myo5b. En estos casos, se desconoce la causa de la afección.

5 Las mutaciones ejemplares del gen ATP8B1 o de la proteína resultante se enumeran en las Tablas 3 y 3, con numeración basada en la proteína ATP8B1 humana de tipo salvaje (p. ej., SEQ ID N°: 1) o gen (p. ej., SEQ ID N°: 2). Las mutaciones ejemplares del gen ABCB11 o de la proteína resultante se enumeran en las Tablas 4 y 5, con numeración basada en la proteína ABCB11 humana de tipo salvaje (p. ej., SEQ ID N°: 3) o gen (p. ej., SEQ ID N°: 4).

10 Como pueden apreciar los expertos en la materia, una posición de aminoácido en una secuencia de proteína de referencia que corresponde a una posición de aminoácido específica en SEQ ID N°: 1 ó 3 puede determinarse alineando la secuencia de la proteína de referencia con SEQ ID N°: 1 ó 3 (p. ej., utilizando un programa informático como ClustalW2). Los cambios en estos residuos (denominados en el presente documento "mutaciones") pueden incluir sustituciones simples o múltiples de aminoácidos, inserciones dentro de las secuencias o flanqueándolas, y deleciones dentro de las secuencias o flanqueándolas. Como pueden apreciar los expertos en la materia, una posición de nucleótidos en una secuencia genética de referencia que corresponde a una posición de nucleótidos específica en SEQ ID N°: 2 ó 4 puede determinarse alineando la secuencia del gen de referencia con SEQ ID N°: 2 ó 4 (p. ej., utilizando un programa informático como ClustalW2). Los cambios en estos residuos (denominados en el presente documento "mutaciones") pueden incluir sustituciones simples o múltiples de nucleótidos, inserciones dentro de las secuencias o flanqueándolas, y deleciones dentro de las secuencias o flanqueándolas. Véase también Kooistra, et al., "KLIFS: A structural kinase-ligand interaction database", Nucleic Acids Res. 2016, vol. 44, no. D1, pp. D365- D371.

Secuencia proteica canónica de ATP8B1 (SEQ ID N°: 1) - Uniprot ID 043520

25 MSTERDSETT FEEDSQFNDE VVPYSDDETE DELDDQGS AV EPEQNRVNRE AEENREFFRK  
 ECTWQVKAND RKYHEQPHEM NTKFLCIKES KYANNAIKTY KYNAFTFIPM NLFEQFKRAA  
 NLYFLALLIL QAVPQISTLA WYTTLVPLLV VLGVTAIKDL VDDVARHKMD KEINNRTCEV  
 IKDGRFKVAK WKEIQVGDVI RLKKNDFVPA DILLLSSEP NSLCYVETAE LDGETNLKFK  
 30 MSLEITDQYL QREDTLATED GFIECEBPNN RLDKPTGTLF WRNTSFPFLDA DKILLRGCVI  
 RNTDFCHGLV IFAGADTKIM KNSGKTRFKR TKIDYLMNYM VYTI FVVLIL LSAGLAIGHA  
 YWEAQVGNSS WYLYDGEDDT PSYRGFLIFW GYIIVLNTMV PISLYVSVEV IRLGQSHFIN  
 35 WDLQMYIAEK DTFKARTTT LNBQLGQIHV IFSDKTGTLT QNIMTFKKCC INGQIYGDHR  
 DASQHNHNKI EQVDFSWNTY ADGKLA FYDH YLIEQIQSGK EPEVRQFFFL LAVCHTVMVD  
 RTDQQLNYQA ASPDEGALVN AARNFGFAFL ARTQNTITIS ELGTERTYNV LAILD FNSDR  
 KRMSLIVRTP EGNIKLYCKG ADTVIYERLH RMNFTKQETQ DALDIFANET LRTLCLCYKE  
 40 IEEKEFTAWN KKFMAASVAS TNRDEALDKV YEEIEKDLIL LGATAIEDKL QDGV PETISK  
 LAKADIKI WV LTGDKKETAE NIGFACELLT EDTTICYGED INSL LHARME NQRNRGGVYA  
 KFAPPVQESF FPPGGRALI ITG SWLNEIL LEKKTFRNKI LKLKFRTEE ERMRTQSKR  
 45 RLEAKKEQRQ KNFVDLACEC SAVICCRVTE KQKAMVVDLV KRYKKAITLA IGDGANDVNM  
 IKTAHIGVGI SCQEGMQAVM SSDYSFAQFR YLQRLLLVHG RWSYIRMCKE LRYFFYKNEA  
 PTLVHFWYSF FNGYSAQTAY EDWFITLYNV LYTSLPVL LM GLLDQDVSDK LSLRFPGLYI  
 VGQRDLLFNY KRFFVSL LHG VLTPMILFFI FLGAYLQTVG QDGEAPSDYQ SFAVTIASAL  
 50 VITVNFQIGL DTSYWTFVNA PSIEGSI ALY FGIMPDFHSA GIHVLFPSAF QFTGTASNAL  
 RQPYIWL TII LAVAVCLLEP VAIRFLSMTI WPSESDKI QK HRKRLKAE EQ WQRRQQVFRR  
 GVSTRRSAYA FSHQRGYADL ISSGRSIRKK RSP LDAIVAD GTAEYRRTGD S

55

60

65

ES 3 002 777 T3

Secuencia canónica de ADN para ATP8B1 (SEQ ID N°: 2)

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ATG AGT ACA GAA AGA GAC TCA GAA ACG ACA TTT GAC GAG GAT TCT CAG CCT  
 AAT GAC GAA GTG GTT CCC TAC AGT GAT GAT GAA ACA GAA GAT GAA CTT GAT  
 GAC CAG GGG TCT GCT GTT GAA CCA GAA CAA AAC CGA GTC AAC AGG GAA GCA  
 GAG GAG AAC CGG GAG CCA TTC AGA AAA GAA TGT ACA TGG CAA GTC AAA GCA  
 AAC GAT CGC AAG TAC CAC GAA CAA CCT CAC TTT ATG AAC ACA AAA TTC TTG  
 TGT ATT AAG GAG AGT AAA TAT GCG AAT AAT GCA ATT AAA ACA TAC AAG TAC  
 AAC GCA TTT ACC TTT ATA CCA ATG AAT CTG TTT GAG CAG TTT AAG AGA GCA  
 GCC AAT TTA TAT TTC CTG GCT CTT CTT ATC TTA CAG GCA GTT CCT CAA ATC  
 TCT ACC CTG GCT TGG TAC ACC ACA CTA GTG CCC CTG CTT GTG GTG CTG GGC  
 GTC ACT GCA ATC AAA GAC CTG GTG GAC GAT GTG GCT CGC CAT AAA ATG GAT  
 AAG GAA ATC AAC AAT AGG ACG TGT GAA GTC ATT AAG GAT GGC AGG TTC AAA  
 GTT GCT AAG TGG AAA GAA ATT CAA GTT GGA GAC GTC ATT CGT CTG AAA AAA  
 AAT GAT TTT GTT CCA GCT GAC ATT CTC CTG CTG TCT AGC TCT GAG CCT AAC  
 AGC CTC TGC TAT GTG GAA ACA GCA GAA CTG GAT GGA GAA ACC AAT TTA AAA  
 TTT AAG ATG TCA CTT GAA ATC ACA GAC CAG TAC CTC CAA AGA GAA GAT ACA  
 TTG GCT ACA TTT GAT GGT TTT ATT GAA TGT GAA GAA CCC AAT AAC AGA CTA  
 GAT AAG TTT ACA GGA ACA CTA TTT TGG AGA AAC ACA AGT TTT CCT TTG GAT  
 GCT GAT AAA ATT TTG TTA CGT GGC TGT GTA ATT AGG AAC ACC GAT TTC TGC  
 CAC GGC TTA GTC ATT TTT GCA GGT GCT GAC ACT AAA ATA ATG AAG AAT AGT  
 GGG AAA ACC AGA TTT AAA AGA ACT AAA ATT GAT TAC TTG ATG AAC TAC ATG  
 GTT TAC ACG ATC TTT GTT GTT CTT ATT CTG CTT TCT GCT GGT CTT GCC ATC  
 GGC CAT GCT TAT TGG GAA GCA CAG GTG GGC AAT TCC TCT TGG TAC CTC TAT  
 GAT GGA GAA GAC GAT ACA CCC TCC TAC CGT GGA TTC CTC ATT TTC TGG GGC  
 TAT ATC ATT GTT CTC AAC ACC ATG GTA CCC ATC TCT CTC TAT GTC AGC GTG  
 GAA GTG ATT CGT CTT GGA CAG AGT CAC TTC ATC AAC TGG GAC CTG CAA ATG  
 TAC TAT GCT GAG AAG GAC ACA CCC GCA AAA GCT AGA ACC ACC ACA CTC AAT

ES 3 002 777 T3

5 GAA CAG CTC GGG CAG ATC CAT TAT ATC TTC TCT GAT AAG ACG GGG ACA CTC  
 ACA CAA AAT ATC ATG ACC TTT AAA AAG TGC TGT ATC AAC GGG CAG ATA TAT  
 GGG GAC CAT CGG GAT GCC TCT CAA CAC AAC CAC AAC AAA ATA GAG CAA GTT  
 GAT TTT AGC TGG AAT ACA TAT GCT GAT GGG AAG CTT GCA TTT TAT GAC CAC  
 TAT CTT ATT GAG CAA ATC CAG TCA GGG AAA GAG CCA GAA GTA CGA CAG TTC  
 TTC TTC TTG CTC GCA GPT TGC CAC ACA GTC ATG GTG GAT AGG ACT GAT GGT  
 10 CAG CTC AAC TAC CAG GCA GCC TCT CCC GAT GAA GGT GCC CTG GTA AAC GCT  
 GCC AGG AAC TTT GGC TTT GCC TTC CTC GCC AGG ACC CAG AAC ACC ATC ACC  
 ATC AGT GAA CTG GGC ACT GAA AGG ACT TAC AAT GTT CTT GCC ATT TTG GAC  
 TTC AAC AGT GAC CGG AAG CGA ATG TCT ATC ATT GTA AGA ACC CCA GAA GGC  
 15 AAT ATC AAG CTT TAC TGT AAA GGT GCT GAC ACT GTT ATT TAT GAA CGG TTA  
 CAT CGA ATG AAT CCF ACT AAG CAA GAA ACA CAG GAT GCC CTG GAT ATC TTT  
 GCA AAT GAA ACT CTT AGA ACC CTA TGC CTT TGC TAC AAG GAA ATT GAA GAA  
 AAA GAA TPT ACA GAA TGG AAT AAA AAG TTT ATG GCT GCC AGT GTG GCC TCC  
 20 ACC AAC CGG GAC GAA GCT CTG GAT AAA GTA TAT GAG GAG APT GAA AAA GAC  
 TTA ATT CTC CTG GGA GCT ACA GCT APT GAA GAC AAG CTA CAG GAT GGA GTT  
 CCA GAA ACC ATT TCA AAA CTT GCA AAA GCT GAC APT AAG ATC TGG GTG CTT  
 25 ACT GGA GAC AAA AAG GAA ACT GCT GAA AAT ATA GGA TTT GCT TGT GAA CTT  
 CTG ACT GAA GAC ACC ACC ATC TGC TAT GGG GAG GAT ATT AAT TCT CTT CTT  
 CAT GCA AGG ATG GAA AAC CAG AGG AAT AGA GGT GGC GTC TAC GCA AAG TTT  
 GCA CCF CCT GTG CAG GAA TCT TTT TTT CCA CCC GST GGA AAC CGT GCC TTA  
 30 ATC ATC ACT GGT TCT TGG TTG AAT GAA APT CTT CTC GAG AAA AAG ACC AAG  
 AGA AAT AAG APT CTG AAG CTG AAG TTC CCA AGA ACA GAA GAA GAA AGA CGG  
 ATG CGG ACC CAA AGT AAA AGG AGG CTA GAA GCT AAG AAA GAG CAG CGG CAG  
 35 AAA AAC TTT GTG GAC CTG GCC TGC GAG TGC AGC GCA GTC ATC TGC TGC CGC  
 GTC ACC CCC AAG CAG AAG GCC ATG GTG GTG GAC CTG GTG AAG AGG TAC AAG  
 AAA GCC ATC ACG CTG GCC ATC GGA GAT GGG GCC AAT GAC GTG AAC ATG ATC  
 AAA ACT GCC CAC APT GGC GTT GGA ATA AGT GGA CAA GAA GGA ATG CAA GCT  
 40 GTC ATG TCG AGT GAC TAT TCC TTT GCT CAG TTC CGA TAT CTG CAG AGG CTA  
 CTG CTG GTG CAT GGC CGA TGG TCT TAC ATA AGG ATG TGC AAG TTC CTA CGA  
 TAC TTC TPT TAC AAA AAC TTT GCC TTT ACT TTG GPT CAT TTC TGG TAC TCC  
 45 TTC TTC AAT GGC TAC TCT GCG CAG ACT GCA TAC GAG GAT TGG TTC ATC ACC  
 CTC TAC AAC GTG CTG TAC ACC AGC CTG CCC GTG CTC CTC ATG GGG CTG CTC  
 GAC CAG GAT GTG AGT GAC AAA CTG AGC CTC CGA TTC CCT GGG TTA TAC ATA  
 GTG GGA CAA AGA GAC TTA CTA TTC AAC TAT AAG AGA TTC TTT GTA AGC TTG  
 50 TTG CAT GGG GTC CTA ACA TCG ATG ATC CTC TTC TTC ATA CCT CTT GGA GCT  
 TAT CTG CAA ACC GTA GGG CAG GAT GGA GAG GCA CCT TCC GAC TAC CAG TCT  
 TTT GCC GTC ACC APT GCC TCT GCT CTT GTA ATA ACA GTC AAT TTC CAG APT  
 GGC TTG GAT ACT TCT TAT TGG ACT TTT GTG AAT GCT TTT TCA APT TTT GGA  
 55 AGC ATT GCA CTT TAT TTT GGC ATC ATG TTT GAC TTT CAT AGT GCT GGA ATA  
 CAT GTT CTC TTT CCA TCT GCA TTT CAA TTT ACA GGC ACA GCT TCA AAC GCT  
 CTG AGA CAG CCA TAC APT TGG TTA ACT ATC ATC CTG GCT GTT GCT GTG TGC  
 60 TTA CTA CCC GTC GTT GCC APT CGA TTC CTG TCA ATG ACC ATC TGG CCA TCA  
 GAA AGT GAT AAG ATC CAG AAG CAT CGC AAG CGG TTG AAG GCG GAG GAG CAG  
 TGG CAG CGA CGG CAG CAG GTG TTC CGC CGG GGC GTG TCA ACC CGG CGC TCG  
 GCC TAC GCC TTC TCG CAC CAG CGG GGC TAC GCG GAC CTC ATC TCC TCC GGG  
 65 CGC AGC ATC CGC AAG AAG CGC TCG CCG CTT GAT GCC ATC GTG GCG GAT GGC  
 ACC GCG GAG TAC AGG CGC ACC GGG GAC AGC TGA

Tabla 2. Mutaciones ejemplares de ATP8B1

	Posición de aminoácido 3 (p. ej., T3K) <sup>27</sup>
5	Posición de aminoácido 23 (p. ej., P23L) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 45 (p. ej., N45T) <sup>5,8,9</sup>
	Posición de aminoácido 46 (p. ej., R46X) <sup>A,28</sup>
	Posición de aminoácido 62 (p. ej., C62R) <sup>28</sup>
10	Posición de aminoácido 63 (p. ej., T63T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 70 (p. ej., D70N) <sup>1, 8</sup>
	Posición de aminoácido 71 (p. ej., R71H) <sup>43</sup>
	Posición de aminoácido 78 (p. ej., H78Q) <sup>19</sup>
	Posición de aminoácido 82 (p. ej., T82T) <sup>41</sup>
15	Posición de aminoácido 92 (p. ej., Y92Y) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 93 (p. ej., A93A) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 96 (p. ej., A96G) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 114 (p. ej., E114Q) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 127 (p. ej., L127P <sup>6</sup> , L127V <sup>26</sup> )
20	Posición de aminoácido 177 (p. ej., T177T) <sup>8</sup>
	Posición de aminoácido 179 (p. ej., E179X) <sup>29</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 185-282 <sup>44</sup>
	Posición de aminoácido 197 (p. ej., G197Lfs*10) <sup>22</sup>
25	Posición de aminoácido 201 (p. ej., R201S <sup>27</sup> , R201H <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 203 (p. ej., K203E <sup>6, 8</sup> , K203R <sup>11</sup> , K203fs <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 205 (p. ej., N205fs <sup>6</sup> , N205Kfs*2 <sup>36</sup> )
	Posición de aminoácido 209 (p. ej., P209T) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 217 (p. ej., S217N) <sup>43</sup>
30	Posición de aminoácido 232 (p. ej., D232D) <sup>30</sup>
	Posición de aminoácido 233 (p. ej., G233R) <sup>38</sup>
	Posición de aminoácido 243 (p. ej., L243fs*28) <sup>33</sup>
	Posición de aminoácido 265 (p. ej., C265R) <sup>25</sup>
35	Posición de aminoácido 271 (p. ej., R271X <sup>13</sup> , R271R <sup>30</sup> )
	Posición de aminoácido 288 (p. ej., L288S) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 294 (p. ej., L294S) <sup>43</sup>
	Posición de aminoácido 296 (p. ej., R296C) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 305 (p. ej., F305I) <sup>28</sup>
40	Posición de aminoácido 306 (p. ej., C306R) <sup>29</sup>
	Posición de aminoácido 307 (p. ej., H307L) <sup>39</sup>
	Posición de aminoácido 308 (p. ej., G308V <sup>1</sup> , G308D <sup>6</sup> , G308S <sup>36</sup> )
	Posición de aminoácido 314 (p. ej., G314S) <sup>13</sup>
45	Posición de aminoácido 320 (p. ej., M320Vfs*13) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 337 (p. ej., M337R) <sup>18</sup>
	Posición de aminoácido 338 (p. ej., N338K) <sup>18</sup>
	Posición de aminoácido 340 (p. ej., M340V) <sup>18</sup>
	Posición de aminoácido 344 (p. ej., I344F) <sup>6, 20</sup>
50	Posición de aminoácido 349 (p. ej., I349T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 358 (p. ej., G358R) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 367 (p. ej., G367G) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 368 (p. ej., N368D) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 393 (p. ej., I393V) <sup>27</sup>
55	Posición de aminoácido 403 (p. ej., S403Y) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 407 (p. ej., S407N) <sup>40</sup>
	Posición de aminoácido 412 (p. ej., R412P) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 415 (p. ej., Q415R) <sup>27</sup>
60	Posición de aminoácido 422 (p. ej., D422H) <sup>30</sup>
	Posición de aminoácido 429 (p. ej., E429A) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 446 (p. ej., G446R) <sup>4, 11</sup>
	Posición de aminoácido 453 (p. ej., S453Y) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 454 (p. ej., D454G) <sup>6</sup>
65	Posición de aminoácido 455 (p. ej., K455N) <sup>40</sup>
	Posición de aminoácido 456 (p. ej., T456M <sup>2, 6</sup> , T456K <sup>36</sup> )

	Posición de aminoácido 457 (p. ej., G457G <sup>5</sup> , G457fs*6 <sup>31</sup> )
	Posición de aminoácido 469 (p. ej., C469G) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 478 (p. ej., H478H) <sup>41</sup>
5	Posición de aminoácido 500 (p. ej., Y500H) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 525 (p. ej., R525X) <sup>4</sup>
	Δ Posición de aminoácido 529 <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 535 (p. ej., H535L <sup>6</sup> , H535N <sup>41</sup> )
	Posición de aminoácido 553 (p. ej., P553P) <sup>43</sup>
10	Posición de aminoácido 554 (p. ej., D554N <sup>1,6</sup> , D554A <sup>35</sup> )
	Δ Posiciones de aminoácido 556-628 <sup>43</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 559-563 <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 570 (p. ej., L570L) <sup>41</sup>
15	Posición de aminoácido 577 (p. ej., I577V) <sup>19</sup>
	Posición de aminoácido 581 (p. ej., E581K) <sup>35</sup>
	Posiciones de aminoácido 554 y 581 (p. ej., D554A + E581K) <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 585 (p. ej., E585X) <sup>27</sup>
20	Posición de aminoácido 600 (p. ej., R600W <sup>2,4</sup> , R600Q <sup>6</sup> )
	Posición de aminoácido 602 (p. ej., R602X) <sup>3,6</sup>
	Posición de aminoácido 628 (p. ej., R628W) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 631 (p. ej., R631Q) <sup>28</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 645-698 <sup>4</sup>
25	Posición de aminoácido 661 (p. ej., I661T) <sup>1,4,6</sup>
	Posición de aminoácido 665 (p. ej., E665X) <sup>4,6</sup>
	Posición de aminoácido 672 (p. ej., K672fs <sup>6</sup> , K672Vfs*1 <sup>30</sup> )
	Posición de aminoácido 674 (p. ej., M674T) <sup>19</sup>
	Posiciones de aminoácido 78 y 674 (p. ej., H78Q/M674T) <sup>19</sup>
30	Posición de aminoácido 684 (p. ej., D684D) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 688 (p. ej., D688G) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 694 (p. ej., I694T <sup>6</sup> , I694N <sup>17</sup> )
	Posición de aminoácido 695 (p. ej., E695K) <sup>27</sup>
35	Posición de aminoácido 709 (p. ej., K709fs <sup>6</sup> , K709Qfs*41 <sup>13</sup> )
	Posición de aminoácido 717 (p. ej., T717N) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 733 (p. ej., G733R) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 757 (p. ej., Y757X) <sup>4</sup>
40	Posición de aminoácido 749 (p. ej., L749P) <sup>21</sup>
	Posición de aminoácido 792 (p. ej., P792fs) <sup>6</sup>
	Δ Posición de aminoácido 795-797 <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 809 (p. ej., I809L) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 814 (p. ej., K814N) <sup>23</sup>
45	Posición de aminoácido 833 (p. ej., R833Q <sup>27</sup> , R833W <sup>41</sup> )
	Posición de aminoácido 835 (p. ej., K835Rfs*36) <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 845 (p. ej., K845fs) <sup>23</sup>
	Posición de aminoácido 849 (p. ej., R849Q) <sup>24</sup>
50	Posición de aminoácido 853 (p. ej., F853S, F853fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 867 (p. ej., R867C <sup>1</sup> , R867fs <sup>6</sup> , R867H <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 885 (p. ej., K885T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 888 (p. ej., T888T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 892 (p. ej., G892R) <sup>6</sup>
55	Posición de aminoácido 912 (p. ej., G912R) <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 921 (p. ej., S921S) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 924 (p. ej., Y924C) <sup>23</sup>
	Posición de aminoácido 930 (p. ej., R930X <sup>6</sup> , R930Q <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 941 (p. ej., R941X) <sup>35</sup>
60	Posición de aminoácido 946 (p. ej., R946T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 952 (p. ej., R952Q <sup>3,9,16</sup> , R952X <sup>6</sup> )
	Posición de aminoácido 958 (p. ej., N958fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 960 (p. ej., A960A) <sup>41</sup>
	Δ Posición de aminoácido 971 <sup>43</sup>
65	Posición de aminoácido 976 (p. ej., A976E <sup>41</sup> , A976A <sup>43</sup> )
	Posición de aminoácido 981 (p. ej., E981K) <sup>30</sup>

	Posición de aminoácido 994 (p. ej., S994R) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 1011 (p. ej., L1011fs*19) <sup>33</sup>
	Posición de aminoácido 1012 (p. ej., S1012I) <sup>10</sup>
5	Posición de aminoácido 1014 (p. ej., R1014X) <sup>6,31</sup>
	Posición de aminoácido 1015 (p. ej., F1015L) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1023 (p. ej., Q1023fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1040 (p. ej., G1040R) <sup>1,8</sup>
10	Posición de aminoácido 1044 (p. ej., S0144L) <sup>34</sup>
	Posición de aminoácido 1047 (p. ej., L1047fs) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 1050 (p. ej., I1050K) <sup>31</sup>
	Posición de aminoácido 1052 (p. ej., L1052R) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 1095 (p. ej., W1095X) <sup>11</sup>
15	Posición de aminoácido 1098 (p. ej., V1098X) <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 1131 (p. ej., Q1131X) <sup>44</sup>
	Posición de aminoácido 1142 (p. ej., A1142Tfs*35) <sup>43</sup>
	Posición de aminoácido 1144 (p. ej., Y1144Y) <sup>43</sup>
20	Posición de aminoácido 1150 (p. ej., I1150T) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 1152 (p. ej., A1152T) <sup>30</sup>
	Posición de aminoácido 1159 (p. ej., P1159P) <sup>26,43</sup>
	Posición de aminoácido 1164 (p. ej., R1164X) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1193 (p. ej., R1193fs*39) <sup>38</sup>
25	Posición de aminoácido 1197 (p. ej., V1197L) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 1208 (p. ej., A1208fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1209 (p. ej., Y1209Lfs*29) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 1211 (p. ej., F1211L) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1219 (p. ej., D1219H <sup>5</sup> , D1219G <sup>27</sup> )
30	Posición de aminoácido 1223 (p. ej., S1223S) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 1233 (p. ej., P1233P) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 1241 (p. ej., G1241fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1248 (p. ej., T1248T) <sup>45</sup>
35	Mutación del sitio de corte y empalme IVS3 + 1 + 3delGTG <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS3 - 2A > G <sup>6</sup>
	IVS6+5T>G <sup>17,26</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS8 + 1G > T <sup>6</sup>
40	IVS9-G>A <sup>26</sup>
	IVS12+1G>A <sup>26</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS17 - 1G > A <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS18 + 2T > C <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS20 - 4CT > AA
45	Mutación del sitio de corte y empalme IVS21 + 5G > A <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS23 - 3C > A <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS26 + 2T > A <sup>6</sup>
	g.24774-42062del <sup>4</sup>
	c.-4C>G <sup>41</sup>
50	c.145C>T <sup>12</sup>
	c.181-72G>A <sup>9</sup>
	c.182-5T>A <sup>41</sup>
	c.182-72G>A <sup>41</sup>
	c.246A > G <sup>9</sup>
55	c.239G > A <sup>36</sup>
	c.279+1_279+3delGTG <sup>45</sup>
	c.280-2A>G <sup>46</sup>
	c.625_627!5delinsACAGTAAT <sup>46</sup>
60	c.554+122C > T <sup>9</sup>
	c.555-3T>C <sup>27</sup>
	c.625+5G>T <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 209 (p. ej., P209T) y c.625+5G>T <sup>4</sup>
65	c.628-30G>A <sup>41</sup>
	c.628-31C>T <sup>41</sup>
	c.698+1G>T <sup>46</sup>

	c.698+20C>T <sup>41</sup>
	c.782-1G>A <sup>45</sup>
	c.782-34G>A <sup>41</sup>
5	Δ795-797 <sup>14</sup>
	c.782-1G>A <sup>4</sup>
	c.852A>C <sup>27</sup>
	c.941-1G>A <sup>46</sup>
	c.1014C>T <sup>9</sup>
10	c.1029+35G>A <sup>11</sup>
	c.1221-8C.G <sup>41</sup>
	1226delA <sup>15</sup>
	c.1429+1G>A <sup>46</sup>
	c.1429+2T>G <sup>19</sup>
15	c.1429 + 49G > A <sup>41</sup>
	c.1430 - 42A > G <sup>41</sup>
	c.1493T > C <sup>12</sup>
	c.1587_1589delCTT <sup>46</sup>
20	c.1630 + 2T > G <sup>27</sup>
	c.1631-10T>A <sup>41</sup>
	c.1637-37T>C <sup>41</sup>
	1660G>A <sup>14</sup>
	1798C>T <sup>14</sup>
25	1798G>A <sup>14</sup>
	c.1819-39_41delAA <sup>9</sup>
	c.1819+1G>A <sup>31</sup>
	c.1820-27G>A <sup>41</sup>
30	c.1918+8C>T <sup>27</sup>
	c.1933-1G>AK46
	c.2097+2T>C <sup>32</sup>
	c.2097+60T>G <sup>41</sup>
35	c.2097+89T>C <sup>41</sup>
	c.2097+97T>G <sup>41</sup>
	c.2210-114T>C <sup>9</sup>
	2210delA <sup>16</sup>
	c.2210-45_50dupATAAAA <sup>9</sup>
40	c.2285+29C.T <sup>41</sup>
	c.2285+32A>G <sup>41</sup>
	c.2286-4_2286-3delinsAA <sup>46</sup>
	c.2418+5G>A <sup>35</sup>
45	c.2707 + 3G > C <sup>27</sup>
	c.2707+9T>G <sup>41</sup>
	c.2707+43A>G <sup>41</sup>
	c.2709-59T>C <sup>41</sup>
	c.2931+9A>G <sup>41</sup>
50	c.2931+59T>A <sup>41</sup>
	c.2932-3C>A <sup>46</sup>
	c.2932+59T>A <sup>9</sup>
	c.2937A>C <sup>27</sup>
	c.3016-9C>A <sup>31</sup>
55	c.3033-3034del <sup>19</sup>
	3122delTCCTA/ insACATCGATGTTGATGTTAGG <sup>45</sup>
	3318G>A <sup>14</sup>
60	c.3400+2T>A <sup>46</sup>
	c.3401-175C>T <sup>9</sup>
	c.3401-167C>T <sup>9</sup>
	c.3401-108C>T <sup>9</sup>
	c.3531 + 8G > T <sup>9,16</sup>
65	c.3532-15C>T <sup>9</sup>
	Δ Phe ex 15 <sup>4</sup>

Ex1_ Ex13del <sup>6</sup>
Ex2_ Ex6del <sup>33</sup>
Ex12_ Ex14del <sup>27</sup>
Exón omitido 24 <sup>45</sup>
del5'UTR-ex18 <sup>11</sup>
c.*11C>T <sup>41</sup>
c.*1101+366G>A <sup>7</sup>
g.92918del565 <sup>31</sup>
GC que precede al exón 16 (p. ej., dando lugar a una delección 4 bp) <sup>42</sup>
Desplazamiento del marco de lectura del extremo 5' del exón 16 <sup>42</sup>
delección 1,4 kb 5' <sup>48</sup>

Tabla 3. Mutaciones seleccionadas de ATP8B1 asociadas con PFIC-1

Posición de aminoácido 23 (p. ej., P23L) <sup>5</sup>
Posición de aminoácido 78 (p. ej., H78Q) <sup>19</sup>
Posición de aminoácido 93 (p. ej., A93A) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 96 (p. ej., A96G) <sup>27</sup>
Posición de aminoácido 127 (p. ej., L127P) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 197 (p. ej., G197Lfs*10) <sup>22</sup>
Posición de aminoácido 205 (p. ej., N205fs) <sup>5</sup>
Posición de aminoácido 209 (p. ej., P209T) <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 233 (p. ej., G233R) <sup>38</sup>
Posición de aminoácido 243 (p. ej., L243fs*28) <sup>33</sup>
Posición de aminoácido 268 (p. ej., L268S) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 296 (p. ej., R296C) <sup>13</sup>
Posición de aminoácido 308 (p. ej., G308V) <sup>1,5</sup>
Posición de aminoácido 320 (p. ej., M320Vfs*13) <sup>11</sup>
Posición de aminoácido 403 (p. ej., S403Y) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 407 (p. ej., S407N) <sup>40</sup>
Posición de aminoácido 412 (p. ej., R412P) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 415 (p. ej., Q415R) <sup>27</sup>
Posición de aminoácido 429 (p. ej., E429A) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 446 (p. ej., G446R) <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 456 (p. ej., T456M) <sup>3,5</sup>
Posición de aminoácido 457 (p. ej., G457G <sup>6</sup> , G457fs*6 <sup>33</sup> )
Posición de aminoácido 500 (p. ej., Y500H) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 525 (p. ej., R525X) <sup>4</sup>
Δ Posición de aminoácido 529 <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 535 (p. ej., H535L) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 554 (p. ej., D554N) <sup>1,6</sup>
Posición de aminoácido 577 (p. ej., I577V) <sup>19</sup>
Posición de aminoácido 585 (p. ej., E585X) <sup>21</sup>
Posición de aminoácido 600 (p. ej., R600W) <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 602 (p. ej., R602X) <sup>3,5</sup>
Posición de aminoácido 661 (p. ej., I661T) <sup>4,6</sup>
Posición de aminoácido 665 (p. ej., E665X) <sup>4,5</sup>
Δ Posiciones de aminoácido 645-699 <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 672 (p. ej., K672fs) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 674 (p. ej., M674T) <sup>19</sup>
Posiciones de aminoácido 78 y 674 (p. ej., H78Q/M674T) <sup>19</sup>
Posición de aminoácido 688 (p. ej., D688G) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 694 (p. ej., I694N) <sup>17</sup>
Posición de aminoácido 695 (p. ej., E695K) <sup>27</sup>
Posición de aminoácido 709 (p. ej., K709fs) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 717 (p. ej., T717N) <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 733 (p. ej., G733R) <sup>5</sup>
Posición de aminoácido 749 (p. ej., L749P) <sup>23</sup>
Posición de aminoácido 757 (p. ej., Y757X) <sup>4</sup>
Posición de aminoácido 792 (p. ej., P792fs) <sup>6</sup>
Posición de aminoácido 809 (p. ej., I809L) <sup>27</sup>

	Posición de aminoácido 853 (p. ej., F853S, F853fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 867 (p. ej., R867fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 892 (p. ej., G892R) <sup>6</sup>
5	Posición de aminoácido 930 (p. ej., R930X <sup>6</sup> , R952Q <sup>15</sup> )
	Posición de aminoácido 952 (p. ej., R952X) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 958 (p. ej., N958fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 981 (p. ej., E981K) <sup>20</sup>
10	Posición de aminoácido 994 (p. ej., S994R) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 1014 (p. ej., R1014X) <sup>6,11</sup>
	Posición de aminoácido 1015 (p. ej., F1015L) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1023 (p. ej., Q1023fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1040 (p. ej., G1040R) <sup>1,6</sup>
15	Posición de aminoácido 1047 (p. ej., L1047fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1095 (p. ej., W1095X) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 1208 (p. ej., A1208fs) <sup>6</sup>
	Posición de aminoácido 1209 (p. ej., Y1209Lfs*28) <sup>4</sup>
	Posición de aminoácido 1211 (p. ej., F1211L) <sup>27</sup>
20	Posición de aminoácido 1219 (p. ej., D1219H <sup>6</sup> , D1219G <sup>27</sup> )
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS3+1 +3delGTG <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS3-2A>G <sup>6</sup>
	IVS6+5T>G <sup>17</sup>
25	Mutación del sitio de corte y empalme IVS8+1G>T <sup>6</sup>
	IVS9-G>A <sup>26</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS17-1G>A <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS18+2T>C <sup>6</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS21+5G>A <sup>6</sup>
30	g.24774-42062del <sup>4</sup>
	c.145C>T <sup>12</sup>
	c.239G>A <sup>28</sup>
	c.625+5 G>T <sup>4</sup>
35	Posición de aminoácido 209 (p. ej., P209T) and c.625+5 G>T <sup>4</sup>
	c.78-1G>A <sup>4</sup>
	c.1493T>C <sup>12</sup>
	c.1830+2T>G <sup>27</sup>
	1680 G>A <sup>14</sup>
40	c.2707+3G>C <sup>27</sup>
	c.2097+2T>C <sup>32</sup>
	c.3033-3034del <sup>19</sup>
	3318 G>A <sup>14</sup>
	c.3158+8G>T <sup>15</sup>
45	Δ Phe ex 15 <sup>4</sup>
	Ex1_ Ex13del <sup>6</sup>
	Ex2_ Ex6del <sup>13</sup>
	Ex12_ Ex14del <sup>27</sup>
	del5'UTR-ex18 <sup>11</sup>
50	c.*1101+366G>A <sup>7</sup>
	GC que precede al exón 16 (p. ej., dando lugar a una deleción de 4 pb) <sup>42</sup>
	Desplazamiento del marco de lectura del extremo 5' del exón 16 <sup>42</sup>

<sup>A</sup> Una mutación a "X" denota un codón de parada temprano

55

*Referencias de las Tablas 2 y 3*

<sup>1</sup> Folmer et al., *Hepatology*. 2009, vol. 50(5), p. 1597-1605. <sup>2</sup> Hsu et al., *Hepatol Res*. 2009, vol. 39, p. 6).  
<sup>3</sup> Alvarez et al., *Hum Mol Genet*. 2004, vol. 13, p. 20).  
60 <sup>4</sup> Davit-Spraul et al., *Hepatology* 2010, vol. 51(5), p. 1645-1655.  
<sup>5</sup> Vitale et al., *J Gastroenterol*. 2018, vol. 53(8), p. 945-958.  
<sup>6</sup> Klomp et al., *Hepatology* 2004, vol. 40(1), p. 27-38. <sup>7</sup> Zarenezhad et al., *Hepatitis Monthly*: 2017, vol. 17(2); e43500.  
<sup>8</sup> Dixon et al., *Scientific Reports* 2017, vol. 7, 11823.  
<sup>9</sup> Painter et al., *Eur J Hum Genet*. 2005, vol. 13, p. 4).  
65 <sup>10</sup> Deng et al., *World J Gastroenterol*. 2012, vol. 18, p. 44).  
<sup>11</sup> Giovannoni et al., *PLoS One*. 2015, vol. 10(12): e0145021.

- 12 Li et al., *Hepatology International* 2017, vol. 11, N.º 1, Sup. Suplemento 1, pp. S180. Número de Resumen: OP284.
- 13 Togawa et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2018, vol. 67, Sup. Suplemento 1, pp. S363. Número de Resumen: 615.
- 14 Miloh et al., *Gastroenterology* 2006, vol. 130, N.º 4, Suppl. 2, pp. A759-A760. Información de la reunión.: Digestive Disease Week Meeting/107th Annual Meeting of the American-Gastroenterological-Association. Los Angeles, CA, EE. UU.. 19 de mayo.
- 15 Drbge et al., *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2015, vol. 53, No. 12. Número de Resumen: A3-27. Info. Reunión: 32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Düsseldorf, Alemania. 22 ene 2016-23 ene 2016
- 16 Mizuochi et al., *Clin Chim Acta.* 2012, vol. 413, p. 15-16).
- 17 Liu et al., *Hepatology International* 2009, vol. 3, N.º 1, p. 184-185. Número de Resumen: PE405. Info. Reunión: 19ª Conferencia de la Asociación de Asia y el Pacífico para el Estudio del Hígado. Hong Kong, China. 13 feb 2009-16 feb 2009
- 18 McKay et al., *Version 2. FIOORes.* 2013; 2: 32. DOI: 10.12688/fi000research.2-32.v2
- 19 Hasegawa et al., *Orphanet J Rare Dis.* 2014, vol. 9:89.
- 20 Stone et al., *J Biol Chem.* 2012, vol. 287(49), p. 41139-51.
- 21 Kang et al., *J Pathol Transl Med.* 2019 May 16. doi: 10.4132/jptm.2019.05.03. [Epub antes de impresión]
- 22 Sharma et al., *BMC Gastroenterol.* 2018, vol. 18(1), p. 107.
- 23 Uegaki et al., *Intern Med.* 2008, vol. 47(7), p. 599-602.
- 24 Goldschmidt et al., *Hepato Res.* 2016, vol. 46, p. 4).
- 25 Liu et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010, vol. 50, p. 2).
- 26 Jung et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, vol. 44(4), p. 453-458.
- 27 Bounford. Universidad de Birmingham. *Dissertation Abstracts International*, (2016) Vol. 75, N.º 1C. N.º de pedido: AAI10588329. ProQuest Dissertations & Theses.
- 28 Stolz et al., *Aliment Pharmacol Ther.* 2019, vol. 49(9), p. 1195-1204.
- 29 Ivashkin et al., *Hepatology International* 2016, vol. 10, N.º 1, Sup. SUPL. 1, pp. S461. Número de Resumen: LBO-38. Info. Reunión: 25ª Conferencia Anual de la Asociación de Asia y el Pacífico para el Estudio del Hígado, APASL 2016. Tokio, Japón. 20 feb 2016-24 feb 2016
- 30 Blackmore et al., *J Clin Exp Hepatol.* 2013, vol. 3(2), p. 159-161.
- 31 Matte et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010, vol. 51(4), p. 488-493.
- 32 Squires et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017, vol. 64(3), p. 425-430.
- 33 Hayshi et al., *EBioMedicine.* 2018, vol. 1, p. 187-199).
- 34 Nagasaka et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, vol. 45, p. 1).
- 35 Wang et al., *PLoS One.* 2016; vol. 11(4): e0153114.
- 36 Narchi et al., *Saudi J Gastroenterol.* 2017, vol. 23, p. 5).
- 37 Alashkar et al., *Blood* 2015, vol. 126, n.º 23. Información de la reunión.: 57ª Reunión Anual de la Sociedad Americana de Hematología. Orlando, FL, EE. UU. Del 05 al 08 de diciembre de 2015. Amer Soc Hematol.
- 38 Ferreira et al., *Pediatric Transplantation* 2013, vol. 17, Sup. SUPL. 1; pp 99. Número de Resumen: 239. Info. Reunión: IPTA 7º Congreso de Trasplante Pediátrico. Varsovia, Polonia. 13 jul 2013- 16 jul 2013.
- 39 Pauli-Magnus et al., *J Hepatol.* 2005, vol. 43(2), p. 342-357.
- 40 Jericó et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2015, vol. 60(3), p. 368-374.
- 41 van der Woerd et al., *PLoS One.* 2013, vol. 8(11): e80553.
- 42 Copeland et al., *J Gastroenterol Hepatol.* 2013, vol. 28(3), p. 560-564.
- 43 Dróge et al., *J Hepatol.* 2017, vol. 67(6), p. 1253-1264.
- 44 Chen et al., *Journal of Pediatrics* 2002, vol. 140(1), p. 119-124.
- 45 Jirsa et al., *Hepato Res.* 2004, vol. 30, p. 1).
- 46 Van der Woerd et al., *Hepatology* 2015, vol. 61(4), p. 1382-1391.

En algunas realizaciones, la mutación en ATP8B1 se selecciona entre L127P, G308V, T456M, D554N, F529del, I661T, E665X, R930X, R952X, R1014X y G1040R.

S

55

60

65

ES 3 002 777 T3

Secuencia Proteica Canónica de ABCB11 (SEQ ID N°: 3) - Uniprot ID 095342

5 MSDSVILRSI KKFGEENDGF ESDRSYNNDK KSRLQDEKKG DGVRVGGFFQL FRESSSTDW  
 LMFVGSILCAF LHGIAQFGVL LIFGTMTDVF IDYDVELQEL QIPGKACVNN TIVWTFNSSLN  
 QNMTNGTRCG LLNIESEMIK FASYIYAGIAV AVLITGYIQI CFWVIAAARQ IQKMRKIFYR  
 10 RIMRMEIGWF DCNSVGELNT RFSDDINKIN DALADQMALF IQRMTSTICG FLLGFFRGWK  
 LTLVIIISVSP LIGIGAATIC LSVSKFTDYE LKAYAKAGVV ADEVISSMRT VAAFGEKRE  
 VERYEKNLVF AQRWGIRKGI VMGFPTGFVW CLIFLCYALA FWYGSTLVLD EGEYTPGTLV  
 QIFLSVIVGA LNLGNASPCLEAFATGRAAA TSIFETIDRK FIIDCMSEDC YKLDRIKGEI  
 15 EFHNVTFHYP SRPEVKILND LNMVIKPGEM TALVGPSPGAG KSTALQLIQR FYDPCEGMVT  
 VDCHDIRSLN IQWLRDQIGI VEQEPVLFST TIAENIRYGR EDATMEDIVQ AAKEANAYNF  
 IMDLPQQFDT LVGEGGGQMS GGQKQVAIA RALIRNPKTL LLDMATSALD NESEAMVQEV  
 LSKIQHGHTI ISVAHRLSTV RAADTIIGFE HGTAVERGTH EELLERKGVY FTLVTLQSQG  
 20 NQALNEEDIK DATEDDMLAR TFSRGSYQDS LEASIRQRSK SQLSYLVHEP PLAVVDHKST  
 YEEDRKDKDI PVQEEVEBPAP VRRILKFSAP EWPYMLVGSV GAAVNGTVTP LYAFLFSQIL  
 GTFSPDKKE QRSQINGVCL LFMVAMCCVSL FTQFLQGYAF AKSGELLTKR LRKFGFRAML  
 25 GQDIAWFDDL ENSPGALTTR LATDASQVQG AAGSQIGMIV NSFTNVTVM IIAFSFSWKL  
 SLVILCFPPF LALSGATQTR MLTGFASRDK QALEMVGQIT NEALSNIRTV AGIGKERREI  
 EALETELEKP EKTAIQKANI YGFCFAFAQC IMFIANSASY RYGGYLISNE GLHFSYVFRV  
 ISAVVLSATA LGRAFSYTPS YAKAKISAAR FFQLLDRQPP ISVYNTAGEK WDNFQCKIDF  
 30 VDCKFTYPSR PDSQVLNGLS VSISPGQTLA FVGSSGCGKS TSIQLLEFFY DFDQGKVMID  
 GHDSKKVNVQ FLRSNIGIVS QEPVLFACSI MDNIKYGDNT KEIPMERVIA AAKQAQLHDF  
 VMSLPEKYET NVGSQGSQLS RGEKQRIATA RAIVRDPKIL LLDEATSALD TESEKTVQVA  
 35 LDKAREGRTC IVIAHRLSTI QNADI IAVMA QGVVIEKGTH EELMAQKGAY YKLVTTGSPIS

40

45

50

55

60

65

Secuencia Canónica de ADN de ABCBII (SEQ ID Nº: 4)

ATG TCF GAC TCA GTA ATT CPT CGA AGT AFA AAG AAA TTT GGA GAG GAG AAT  
 GAT GGT TTT GAG TCA GAT AAA TCA TAT AAT AAT GAT AAG AAA TCA AGG TTA  
 CAA GAT GAG AAG AAA GGT GAT GGC GTT AGA GTT GGC TTC TTT CAA TTG TTT  
 CGG TTT TCT TCA TCA ACT GAC APT TGG CTG ATG TTT GTG GGA AGT TTG TGT  
 GCA TTT CTC CAT GGA ATA GCC CAG CCA GGC GTG CTA CTC ATT TPT GGC ACA  
 ATG ACA GAT GTT TTT ATT GAC TAC GAC GPT GAG TTA CAA GAA CTC CAG ATT  
 CCA GGA AAA GCA TGT GTG AAT AAC ACC ATT GTA TGG ACT AAC AGT TCC CTC  
 AAC CAG AAC ATG ACA AAT GGA ACA CGT TGT GGG TTG CTG AAC ATC GAG AGC  
 GAA ATG ATC AAA TTT GCC AGT TAC TAT GCT GGA ATT GCT GTC GCA GTA CTT  
 ATC ACA GGA TAT ATT CAA ATA TGC TTT TGG GTC ATT GCC GCA GCT CGT CAG  
 ATA CAG AAA ATG AGA AAA TPT TAC TPT AGG AGA ATA ATG AGA ATG GAA ATA  
 GGG TGG TPT GAC TGC AAT TCA GTG GGG GAG CTG AAT ACA AGA TTC TCT GAT  
 GAT ATT AAT AAA ATC AAT GAT GCC AFA GCT GAC CAA ATG GCC CTT TTC ATT  
 CAG CGC ATG ACC TCG ACC ATC TGT GGT TTC CTG TTG GGA TTT TTC AGG GGT  
 TGG AAA CTG ACC TTG GPT ATT ATT TCT GTC AGC CCT CTC ATT GGG ATT GGA  
 GCA GCC ACC ATT GGT CTG AGT GTG FCC AAG TTT ACG GAC TAT GAG CTG AAG  
 GCC TAT GCC AAA GCA GGG GTG GTG GCT GAT GAA GTC ATT TCA TCA ATG AGA  
 ACA GTG GCT GCT TTT GGT GGT GAG AAA AGA GAG GPT GAA AGG TAT GAG AAA  
 AAT CTT GTG TTC GCC CAG CGT TGG GGA ATT AGA AAA GGA ATA GTG ATG GGA  
 TTC TTT ACT GGA TTC GTG TGG TGT CTC AFC TTT TTG TGT TAT GCA CTG GCC  
 TTC TGG TAC GGC TCC ACA CTT GTC CTG GAT GAA GGA GAA TAT ACA CCA GGA  
 ACC CPT GTC CAG APT TTC CTC AGT GTC ATA GTA GGA GCT TTA AAT CPT GGC  
 AAT GCC TCT CCT TGT TTG GAA GCC TTT GCA ACT GGA CPT GCA GCA GCC ACC  
 AGC APT TTT GAG ACA ATA GAC AGG AAA CCC ATC APT GAC TGC ATG TCA GAA  
 GAT GGT TAC AAG TTG GAT CGA ATC AAG GGT GAA APT GAA TTC CAT AAT GTG  
 ACC TTC CAT TAT CCT TCC AGA CCA GAG GTG AAG APT CTA AAT GAC CTC AAC  
 ATG GTC APT AAA CCA GGG GAA ATG ACA GCT CTG GTA GGA CCC AGT GGA GCT  
 GGA AAA AGT ACA GCA CTG CAA CTC APT CAG CGA TTC TAT GAC CCC TGT GAA  
 GGA ATG GTG ACC GTG GAT GGC CAT GAC APT CGC TCT CTT AAC APT CAG TGG  
 CTT AGA GAT CAG ATT GGG ATA GTG GAG CAA GAG CCA GPT CTG TTC TCT ACC  
 ACC APT GCA GAA AAT APT CGC TAT GGC AGA GAA GAT GCA ACA ATG GAA GAC  
 AFA GTC CAA GCT GCC AAG GAG GCC AAT GCC TAC AAC TTC ATC ATG GAC CTG  
 CCA CAG CAA TTT GAC ACC CPT GPT GGA GAA GGA GGA GGC CAG ATG AGT GGT  
 GGC CAG AAA CAA AGG GTA GCT ATC GCC AGA GCC CTC ATC CGA AAT CCC AAG  
 APT CTG CTT TTG GAC ATG GCC ACC TCA GCT CTG GAC AAT GAG AGT GAA GCC  
 ATG GTC CAA GAA GTG CTG AGT AAG APT CAG CAT GGG CAC ACA ATC APT TCA  
 GPT GCT CAT CGC TTG TCT ACG GTC AGA GCT GCA GAT ACC ATC APT GGT TTT  
 GAA CAT GGC ACT GCA GTG GAA AGA GGG ACC CAT GAA GAA TTA CTG GAA AGG  
 AAA GGT GPT TAC TTC ACT CTA GTG ACT TTG CAA AGC CAG GGA AAT CAA GCT  
 CTT AAT GAA GAG GAC ATA AAG GAT GCA ACT GAA GAT GAC ATG CTT GCG AGG  
 ACC TTT AGC AGA GGG AGC TAC CAG GAT AGT TTA AGG GCT TCC ATC CGG CAA  
 CGC TCC AAG TCT CAG CPT TCT TAC CTG GTG CAC GAA CCT CCA TTA GCT GTT  
 GTA GAT CAT AAG TCT ACC TAT GAA GAA GAT AGA AAG GAC AAG GAC ATT CCT  
 GTG CAG GAA GAA GPT GAA CCT GCC CCA GTT AGG AGG APT CTG AAA TTC AGT  
 GCT CCA GAA TGG CCC TAC ATG CTG GTA GGG TCT GTG GGT GCA GCT GTG AAC  
 GGG ACA GTC ACA CCC TTG TAT GCC TTT TTA TTC AGC CAG APT CPT GGG ACT  
 TPT TCA APT CCT GAT AAA GAG GAA CAA AGG TCA CAG ATC AAT GGT GTG TGC  
 CTA CTT TTT GTA GCA ATG GGC TGT GTA TCT CTT TTC ACC CAA TTT CTA CAG  
 GGA TAT GCC TTT GCT AAA TCT GGG GAG CTC CTA ACA AAA AGG CTA CGT AAA  
 TTT GGT TTC AGG GCA ATG CTG GGG CAA GAT APT GCC TGG TTT GAT GAC CTC

ES 3 002 777 T3

5 AGA AAF AGC CCT GGA GCA TTG ACA ACA AGA CTT GCT ACA GAT GCT TCC CAA  
 GTT CAA GGG GCT GCC GGC TCT CAG ATC GGG ATG ATA GTC AAT TCC TTC ACT  
 AAC GTC ACT GTG GCC ATG ATC ATT GCC TTC TCC TTT AGC TGG AAG CTG AGC  
 10 CTG GTC ATC TTG TGC TTC TTC CCC TTC TTG GCT TTA TCA GGA GCC ACA CAG  
 ACC AGG ATG TTG ACA GGA TTT GCC TCT CGA GAT AAG CAG GCC CTG GAG ATG  
 GTG GGA CAG ATT ACA AAT GAA GCC CTC AGT AAC ATC CGC ACT GTT GCT GGA  
 15 APT GGA AAG GAG AGG CGG TTC ATT GAA GCA CTT GAG ACT GAG CTG GAG AAG  
 CCC TTC AAG ACA GCC APT CAG AAA GCC AAT ATT TAC GGA TTC TGC TTT GCC  
 TTT GCC CAG TGC ATC ATG TTT ATT GCG AAT TCT GCT TCC TAC AGA TAT GGA  
 GGT TAC TTA ATC TCC AAT GAG GGG CTC CAT TTC AGC TAT GTG TTC AGG GTG  
 20 APT TCT GCA GTT GTA CTG AGT GCA ACA GCT CTT GGA AGA GCC TTC TCT TAC  
 ACC CCA AGT TAT GCA AAA GCT AAA ATA TCA GCT GCA CEC PTT TTT CAA CTG  
 CTG GAC CGA CAA CCC CCA ATC AGT GTA TAC AAT ACT GCA GGT GAA AAA TGG  
 GAC AAC TTC CAG GGG AAG ATT GAT TTT GTT GAT TGT AAA PTT ACA TAT CCT  
 25 TCT CGA CCT GAC TCG CAA GTT CTG AAT GGT CTC TCA GTG TCG ATT AGT CCA  
 GCG CAG ACA CTG GCG PTT GTT GCG ACC AGT GGA TGT GGC AAA AGC ACT AGC  
 APT CAG CTG TTG GAA CGT TTC TAT GAT CCT GAT CAA GGG AAG GTG ATG ATA  
 GAT GGT CAT GAC AGC AAA AAA GTA AAT GTC CAG TTC CTC CGC TCA AAC ATT  
 GGA APT GTT TCC CAG GAA CCA GTG TTG TTT GCC TGT AGC ATA ATG GAC AAT  
 30 APT AAG TAT GGA GAC AAC ACC AAA GAA ATT CCC ATG GAA AGA GTC ATA GCA  
 GCT GCA AAA CAG GCT CAG CTG CAT GAT TTT GTC ATG TCA CTC CCA GAG AAA  
 TAT GAA ACT AAC GTT GGG TCC CAG GGG TCT CAA CTC TCT AGA GGG GAG AAA  
 CAA CGC ATT GCT APT GCT CGG GCC APT GTA CGA GAT CCT AAA ATC TTG CTA  
 CTA GAT GAA GCC ACT TCT GCC TTA GAC ACA GAA AGT GAA AAG ACG CTG CAG  
 35 GPT GCT CTA GAC AAA GCC AGA GAG GGT CGG ACC TGC APT GTC ATT GCC CAT  
 CGC TTG TCC ACC ATC CAG AAC GCG GAT ATC APT GCT GTC ATG GCA CAG GGG  
 GTG GTG APT GAA AAG GGG ACC CAT GAA GAA CTG ATG GCC CAA AAA GGA GCC  
 40 TAC TAC AAA CTA GTC ACC ACT GGA TCC CCC ATC AGT TGA

40

45

50

55

60

65

Tabla 4. Mutaciones Ejemplares de ABCB11

5	Posición de aminoácido 1 (p. ej., M1V) <sup>3</sup>
	Posición de aminoácido 4 (p. ej., S4X) <sup>A,54</sup>
	Posición de aminoácido 8 (p. ej., R8X) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 19 (p. ej., G19R) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 24 (p. ej., K24X) <sup>35</sup>
	Posición de aminoácido 25 (p. ej., S25X) <sup>5,14</sup>
10	Posición de aminoácido 26 (p. ej., Y26ifs*7) <sup>36</sup>
	Posición de aminoácido 36 (p. ej., D36D) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 38 (p. ej., K38Rfs*24) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 43 (p. ej., V43I) <sup>27</sup>
15	Posición de aminoácido 49 (p. ej., Q49X) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 50 (p. ej., L50S, L50W) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 52 (p. ej., R52W <sup>28</sup> , R52R <sup>28</sup> )
	Posición de aminoácido 56 (p. ej., S56L) <sup>33</sup>
	Posición de aminoácido 58 (p. ej., D58N) <sup>62</sup>
20	Posición de aminoácido 62 (p. ej., M62K) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 66 (p. ej., S66N) <sup>17</sup>
	Posición de aminoácido 68 (p. ej., C68Y) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 60 (p. ej., L50S) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 71 (p. ej., L71H) <sup>73</sup>
25	Posición de aminoácido 74 (p. ej., I74R) <sup>71</sup>
	Posición de aminoácido 77 (p. ej., P77A) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 87 (p. ej., T87R) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 90 (p. ej., F90F) <sup>7,27</sup>
	Posición de aminoácido 93 (p. ej., Y93S <sup>13</sup> , Y93X <sup>58</sup> )
30	Posición de aminoácido 96 (p. ej., E96X) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 97 (p. ej., L97X) <sup>33</sup>
	Posición de aminoácido 101 (p. ej., Q101Dfs*8) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 107 (p. ej., C107R) <sup>36</sup>
	Posición de aminoácido 112 (p. ej., I112T) <sup>9</sup>
35	Posición de aminoácido 114 (p. ej., W114R) <sup>2,5</sup>
	Posición de aminoácido 123 (p. ej., M123T) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 127 (p. ej., T127Hfs*6) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 129 (p. ej., C129Y) <sup>25</sup>
	Posición de aminoácido 130 (p. ej., G130G) <sup>77</sup>
40	Posición de aminoácido 134 (p. ej., I134I) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 135 (p. ej., E135K <sup>7,13</sup> , E135L <sup>17</sup> )
	Posición de aminoácido 137 (p. ej., E137K) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 157 (p. ej., Y157C) <sup>5</sup>
45	Posición de aminoácido 161 (p. ej., C161X) <sup>36</sup>
	Posición de aminoácido 164 (p. ej., V164Gfs*7 <sup>35</sup> , V164I <sup>85</sup> )
	Posición de aminoácido 167 (p. ej., A167S <sup>4</sup> , A167V <sup>7</sup> , A167T <sup>3,12</sup> )
	Posición de aminoácido 181 (p. ej., R181I) <sup>33</sup>
	Posición de aminoácido 182 (p. ej., I182K) <sup>9</sup>
50	Posición de aminoácido 183 (p. ej., M183V <sup>9</sup> , M183T <sup>9</sup> )
	Posición de aminoácido 185 (p. ej., M185I) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 186 (p. ej., E186G) <sup>2,7,22</sup>
	Posición de aminoácido 188 (p. ej., G188W) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 194 (p. ej., S194P) <sup>7</sup>
55	Posición de aminoácido 198 (p. ej., L198P) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 199 (p. ej., N199ifs*15X) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 206 (p. ej., I206V) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 212 (p. ej., A212T) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 217 (p. ej., M217R) <sup>36</sup>
60	Posición de aminoácido 225 (p. ej., T225P) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 226 (p. ej., S226L) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 232 (p. ej., L232Cfs*9) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 233 (p. ej., L233S) <sup>86</sup>
	Posición de aminoácido 238 (p. ej., G238V) <sup>2,7</sup>
65	Posición de aminoácido 242 (p. ej., T242I) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 245 (p. ej., I245Tfs*26) <sup>57</sup>

	Posición de aminoácido 256 (p. ej., A256G) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 260 (p. ej., G260D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 269 (p. ej., Y269Y) <sup>27</sup>
5	Posición de aminoácido 277 (p. ej., A277E) <sup>77</sup>
	Posición de aminoácido 283 (p. ej., E283D) <sup>73</sup>
	Posiciones de aminoácido 212 y 283 (p. ej., A212T + E283D) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 284 (p. ej., V284L <sup>7,39</sup> , V284A <sup>7</sup> , V284D <sup>23</sup> )
	Posición de aminoácido 297 (p. ej., E297G <sup>1,2,5,7</sup> , E297K <sup>7</sup> )
10	Posición de aminoácido 299 (p. ej., R299K) <sup>29</sup>
	Posición de aminoácido 303 (p. ej., R303K <sup>8</sup> , R303M <sup>63</sup> , R303fsX321 <sup>63</sup> )
	Posición de aminoácido 304 (p. ej., Y304X) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 312 (p. ej., Q312H) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 313 (p. ej., R313S) <sup>5,7</sup>
15	Posición de aminoácido 314 (p. ej., W314X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 318 (p. ej., K318Rfs*26) <sup>23</sup>
	Posición de aminoácido 319 (p. ej., G319G) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 327 (p. ej., G327E) <sup>5,7</sup>
20	Posición de aminoácido 330 (p. ej., W330X) <sup>24</sup>
	Posición de aminoácido 336 (p. ej., C336S) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 337 (p. ej., Y337H) <sup>21,27</sup>
	Posición de aminoácido 342 (p. ej., W342G) <sup>60</sup>
	Posición de aminoácido 354 (p. ej., R354X) <sup>9</sup>
25	Posición de aminoácido 361 (p. ej., Q361X <sup>57</sup> , Q361R <sup>74</sup> )
	Posición de aminoácido 366 (p. ej., V366V <sup>25</sup> , V366D <sup>57</sup> )
	Posición de aminoácido 368 (p. ej., V368Rfs*27) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 374 (p. ej., G374S) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 380 (p. ej., L380Wfs*18) <sup>5</sup>
30	Posición de aminoácido 382 (p. ej., A382G) <sup>68</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 382-388 <sup>5</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 383-389 <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 387 (p. ej., R387H) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 390 (p. ej., A390P) <sup>5,7</sup>
35	Posición de aminoácido 395 (p. ej., E395E) <sup>25</sup>
	Posición de aminoácido 404 (p. ej., D404G) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 410 (p. ej., G410D) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 413 (p. ej., L413W) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 415 (p. ej., R415X) <sup>42</sup>
40	Posición de aminoácido 416 (p. ej., I416I) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 420 (p. ej., I420T) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 423 (p. ej., H423R) <sup>13</sup>
	Posición de aminoácido 432 (p. ej., R432T) <sup>1,2,7</sup>
45	Posición de aminoácido 436 (p. ej., K436N) <sup>40</sup>
	Posición de aminoácido 440 (p. ej., D440E) <sup>69</sup>
	Posición de aminoácido 444 (p. ej., V444A) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 454 (p. ej., V454X) <sup>49</sup>
	Posición de aminoácido 455 (p. ej., G455E) <sup>5</sup>
50	Posición de aminoácido 457 (p. ej., S457Vfs*23) <sup>38</sup>
	Posición de aminoácido 461 (p. ej., K461E) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 462 (p. ej., S462R) <sup>63</sup>
	Posición de aminoácido 463 (p. ej., T463I) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 466 (p. ej., Q466K) <sup>5,7</sup>
55	Posición de aminoácido 470 (p. ej., R470Q <sup>5,7</sup> , R470X <sup>9</sup> )
	Posición de aminoácido 471 (p. ej., Y472X) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 472 (p. ej., Y472C <sup>5,27</sup> , Y472X <sup>14</sup> )
	Posición de aminoácido 473 (p. ej., D473Q <sup>56</sup> , D473V <sup>66</sup> )
	Posición de aminoácido 475 (p. ej., C475X) <sup>25</sup>
60	Posición de aminoácido 481 (p. ej., V481E) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 482 (p. ej., D482G) <sup>2,5,7</sup>
	Posición de aminoácido 484 (p. ej., H484Rfs*5) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 487 (p. ej., R487H <sup>2</sup> , R487P <sup>5</sup> )
	Posición de aminoácido 490 (p. ej., N490D) <sup>5,7</sup>
65	Posición de aminoácido 493 (p. ej., W493X) <sup>8</sup>
	Posición del aminoácido 496 (p. ej., D496V) <sup>58</sup>

	Posición de aminoácido 498 (p. ej., I498T) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 499 (p. ej., G499E) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 501 (p. ej., V501G) <sup>58</sup>
5	Posición de aminoácido 504 (p. ej., E504K) <sup>79</sup>
	Posición de aminoácido 510 (p. ej., T510T) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 512 (p. ej., I512T) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 515 (p. ej., N515T <sup>5,7</sup> , N515D <sup>54</sup> )
	Posición de aminoácido 518 (p. ej., I518M) <sup>17</sup>
10	Posición de aminoácido 517 (p. ej., R517H) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 520 (p. ej., R520X) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 523 (p. ej., A523G) <sup>13</sup>
	Posición de aminoácido 528 (p. ej., I528Sfs*21 <sup>5</sup> , I528X <sup>3</sup> , I528T <sup>79</sup> )
	Posición de aminoácido 535 (p. ej., A535A <sup>7</sup> , A535X <sup>65</sup> )
15	Posición de aminoácido 540 (p. ej., F540L) <sup>45</sup>
	Posición de aminoácido 541 (p. ej., I541L <sup>5,7</sup> , I541T <sup>5,17</sup> )
	Posición de aminoácido 546 (p. ej., Q546K <sup>39</sup> , Q546H <sup>73</sup> )
	Posición de aminoácido 548 (p. ej., F548Y) <sup>5,7</sup>
20	Posición de aminoácido 549 (p. ej., D549V) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 554 (p. ej., E554K) <sup>21</sup>
	Posición de aminoácido 556 (p. ej., G556R) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 558 (p. ej., Q558H) <sup>23</sup>
	Posición de aminoácido 559 (p. ej., M559T) <sup>57</sup>
25	Posición de aminoácido 562 (p. ej., G562D <sup>5,7</sup> , G562S <sup>7,5</sup> )
	Posición de aminoácido 570 (p. ej., A570T <sup>2,5,7</sup> , A570V <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 575 (p. ej., R575X <sup>4,5</sup> , R575Q <sup>21</sup> )
	Posición de aminoácido 580 (p. ej., L580P) <sup>37</sup>
	Posición de aminoácido 586 (p. ej., T586I) <sup>7</sup>
30	Posición de aminoácido 587 (p. ej., S587X) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 588 (p. ej., A588V <sup>5,7</sup> , A588P <sup>79</sup> )
	Posición de aminoácido 591 (p. ej., N591S) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 593 (p. ej., S593R) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 597 (p. ej., V597V <sup>3</sup> , V597L <sup>13</sup> )
35	Posición de aminoácido 603 (p. ej., K603K) <sup>55</sup>
	Posición de aminoácido 609 (p. ej., H609Hfs*46) <sup>25</sup>
	Posición de aminoácido 610 (p. ej., I610Gfs*45 <sup>3</sup> , I610T <sup>57</sup> ) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 615 (p. ej., H615R) <sup>35</sup>
40	Posición de aminoácido 616 (p. ej., R616G <sup>28</sup> , R616H <sup>73</sup> )
	Posición de aminoácido 619 (p. ej., T619A) <sup>29</sup>
	Posición de aminoácido 623 (p. ej., A623A) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 625 (p. ej., T625Nfs*5) <sup>25</sup>
	Posición de aminoácido 627 (p. ej., I627T) <sup>7</sup>
45	Posición de aminoácido 628 (p. ej., G628Wfs*3) <sup>70</sup>
	Posición de aminoácido 636 (p. ej., E636G) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 648 (p. ej., G648Vfs*6 <sup>5</sup> , G648V <sup>50</sup> )
	Posición de aminoácido 655 (p. ej., T655I) <sup>7</sup>
50	Posición de aminoácido 669 (p. ej., I669V) <sup>25</sup>
	Posición de aminoácido 676 (p. ej., D676Y) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 677 (p. ej., M677V) <sup>7,13</sup>
	Posición de aminoácido 679 (p. ej., A679V) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 685 (p. ej., G685W) <sup>60</sup>
55	Posición de aminoácido 696 (p. ej., R696W <sup>27</sup> , R696Q <sup>55</sup> )
	Posición de aminoácido 698 (p. ej., R698H <sup>7,9</sup> , R698K <sup>61</sup> , R698C <sup>65</sup> )
	Posición de aminoácido 699 (p. ej., S699P) <sup>31</sup>
	Posición de aminoácido 701 (p. ej., S701P) <sup>59</sup>
	Posición de aminoácido 702 (p. ej., Q702X) <sup>86</sup>
60	Posición de aminoácido 709 (p. ej., E709K) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 710 (p. ej., P710P) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 712 (p. ej., L712L) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 721 (p. ej., Y721C) <sup>88</sup>
	Posición de aminoácido 729 (p. ej., D724N) <sup>88</sup>
65	Posición de aminoácido 731 (p. ej., P731S) <sup>28</sup>
	Posición de aminoácido 740 (p. ej., P740Qfs*6) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 756 (p. ej., G756R) <sup>5</sup>

	Posición de aminoácido 766 (p. ej., G766R) <sup>5,24</sup>
	Posición de aminoácido 772 (p. ej., Y772X) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 804 (p. ej., A804A) <sup>7</sup>
5	Posición de aminoácido 806 (p. ej., G806D <sup>44</sup> , G806G <sup>55</sup> )
	Posición de aminoácido 809 (p. ej., S809F) <sup>61</sup>
	Posición de aminoácido 817 (p. ej., G817G) <sup>68</sup>
	Posición de aminoácido 818 (p. ej., Y818F) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 824 (p. ej., G824E) <sup>42</sup>
10	Posición de aminoácido 825 (p. ej., G825G) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 830 (p. ej., R830Gfs*28) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 832 (p. ej., R832C <sup>7,36</sup> , R832H <sup>41</sup> )
	Posición de aminoácido 842 (p. ej., D842G) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 848 (p. ej., D848N) <sup>73</sup>
15	Posición de aminoácido 855 (p. ej., G855R) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 859 (p. ej., T859R) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 865 (p. ej., A865V) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 866 (p. ej., S866A) <sup>57</sup>
20	Posición de aminoácido 868 (p. ej., V868D) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 869 (p. ej., Q869P) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 875 (p. ej., Q875X) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 877 (p. ej., G877R) <sup>58</sup>
	Posición de aminoácido 879 (p. ej., I879R) <sup>58</sup>
25	Posición de aminoácido 893 (p. ej., A893V) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 901 (p. ej., S901R <sup>17</sup> , S901I <sup>10</sup> )
	Posición de aminoácido 903 (p. ej., V903G) <sup>57</sup>
	Δ Posición de aminoácido 919 <sup>12</sup>
	Posición de aminoácido 923 (p. ej., T923P) <sup>2,7</sup>
30	Posición de aminoácido 926 (p. ej., A926P) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 928 (p. ej., R928X <sup>16</sup> , R928Q <sup>46</sup> )
	Posición de aminoácido 930 (p. ej., K930X <sup>5</sup> , K930Efs*79 <sup>5,10</sup> , K930Efs*49 <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 931 (p. ej., Q931P) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 945 (p. ej., S945N) <sup>57</sup>
35	Posición de aminoácido 948 (p. ej., R948C) <sup>5,7,26</sup>
	Posición de aminoácido 958 (p. ej., R958Q) <sup>38</sup>
	Posición de aminoácido 969 (p. ej., K969K) <sup>38</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 969-972 <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 973 (p. ej., T973I) <sup>57</sup>
40	Posición de aminoácido 976 (p. ej., Q976R <sup>58</sup> , Q976X <sup>56</sup> )
	Posición de aminoácido 979 (p. ej., N979D) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 981 (p. ej., Y981Y) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 982 (p. ej., G982R) <sup>2,5,7</sup>
45	Posiciones de aminoácido 444 y 982 (p. ej., V444A + G982R) <sup>38</sup>
	Posición de aminoácido 995 (p. ej., A995A) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 1001 (p. ej., R1001R) <sup>3</sup>
	Posición de aminoácido 1003 (p. ej., G1003R) <sup>24</sup>
	Posición de aminoácido 1004 (p. ej., G1004D) <sup>2,7</sup>
50	Posición de aminoácido 1027 (p. ej., S1027R) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 1028 (p. ej., A1028A <sup>7,19,88</sup> , A1028E <sup>36</sup> )
	Posición de aminoácido 1029 (p. ej., T1029K) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 1032 (p. ej., G1032R) <sup>12</sup>
	Posición de aminoácido 1041 (p. ej., Y1041X) <sup>3</sup>
55	Posición de aminoácido 1044 (p. ej., A1044P) <sup>68</sup>
	Posición de aminoácido 1050 (p. ej., R1050C) <sup>2,7,57</sup>
	Posición de aminoácido 1053 (p. ej., Q1053X) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 1055 (p. ej., L1055P) <sup>36</sup>
	Posición de aminoácido 1057 (p. ej., R1057X <sup>2</sup> , R1057Q <sup>58</sup> )
60	Posición de aminoácido 1058 (p. ej., Q1058Hfs*38 <sup>3</sup> , Q1058fs*38 <sup>17</sup> , Q1058X <sup>73</sup> )
	Posición de aminoácido 1061 (p. ej., I1061Vfs*34) <sup>3</sup>
	Posición de aminoácido 1083 (p. ej., C1083Y) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1086 (p. ej., T1086T) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 1090 (p. ej., R1090X) <sup>2,5</sup>
65	Posición de aminoácido 1099 (p. ej., L1099Lfs*38) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 1100 (p. ej., S1100Qfs*38) <sup>13</sup>

	Posición de aminoácido 1110 (p. ej., A1110E) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 1112 (p. ej., V1112F) <sup>70</sup>
	Posición de aminoácido 1116 (p. ej., G1116R <sup>7</sup> , G1116F <sup>8,17</sup> , G1116E <sup>85</sup> )
5	Posición de aminoácido 1120 (p. ej., S1120N) <sup>80</sup>
	Posición de aminoácido 1126 (p. ej., R1128H <sup>2,7</sup> , R1128C <sup>5,7,15</sup> )
	Posición de aminoácido 1131 (p. ej., D1131V) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1144 (p. ej., S1144R) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1147 (p. ej., V1147X) <sup>5</sup>
10	Posición de aminoácido 1153 (p. ej., R1153C <sup>2,5,7</sup> , R1153H <sup>5</sup> )
	Posición de aminoácido 1154 (p. ej., S1154P) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 1162 (p. ej., E1162X) <sup>80</sup>
	Δ Posición de aminoácido 1165 <sup>85</sup>
	Posición de aminoácido 1164 (p. ej., V1164Gfs*7)
15	Posición de aminoácido 1173 (p. ej., N1173D) <sup>87</sup>
	Posición de aminoácido 1175 (p. ej., K1175T) <sup>88</sup>
	Posición de aminoácido 1186 (p. ej., E1186K) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1192 (p. ej., A1192Efs*50) <sup>11</sup>
20	Posición de aminoácido 1196 (p. ej., Q1196X) <sup>85</sup>
	Posición de aminoácido 1197 (p. ej., L1197G) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1198 (p. ej., H1198R) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1204 (p. ej., L1204P) <sup>80</sup>
	Posición de aminoácido 1208 (p. ej., Y1208C) <sup>73</sup>
25	Posición de aminoácido 1210 (p. ej., T1210P <sup>5,7</sup> , T1210F <sup>57</sup> )
	Posición de aminoácido 1211 (p. ej., N1211D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1212 (p. ej., V1212F) <sup>85</sup>
	Posición de aminoácido 1215 (p. ej., Q1215X) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 1221 (p. ej., R1221K) <sup>53</sup>
30	Posición de aminoácido 1223 (p. ej., E1223D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1226 (p. ej., R1226P) <sup>73</sup>
	Posición de aminoácido 1228 (p. ej., A1228V) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1231 (p. ej., R1231W <sup>5,7</sup> , R1231Q <sup>5,7</sup> )
	Posición de aminoácido 1232 (p. ej., A1232D) <sup>17</sup>
35	Posición de aminoácido 1235 (p. ej., R1235X) <sup>8,12</sup>
	Posición de aminoácido 1242 (p. ej., L1242I) <sup>5,7</sup>
	Posición de aminoácido 1243 (p. ej., D1243G) <sup>87</sup>
	Posición de aminoácido 1249 (p. ej., L1249X) <sup>75</sup>
	Posición de aminoácido 1256 (p. ej., T1256fs*1296) <sup>83</sup>
40	Posición de aminoácido 1268 (p. ej., R1268Q) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 1276 (p. ej., R1276H) <sup>80</sup>
	Posición de aminoácido 1283 (p. ej., A1283A <sup>28</sup> , A1283V <sup>86</sup> )
	Posición de aminoácido 1292 (p. ej., G1292V) <sup>73</sup>
45	Posición de aminoácido 1298 (p. ej., G1298R) <sup>85</sup>
	Posición de aminoácido 1302 (p. ej., E1302X) <sup>5</sup>
	Posición de aminoácido 1311 (p. ej., Y1311X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 1316 (p. ej., T1316Lfs*64) <sup>10</sup>
	Posición de aminoácido 1321 (p. ej., S1321N) <sup>87</sup>
50	Intrón 4 ((+3)A>C) <sup>1</sup>
	IVS4-74A>T <sup>80</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 3', Intrón 5 c.3901G > A <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 7 c.6111G > A <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS7 + 1G > A <sup>14</sup>
55	IVS7+5G>A <sup>40</sup>
	IVS8+1G>C <sup>76</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 9 c.9081delG <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 9 c.9081G > T <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 9 c.9081G > A <sup>5</sup>
60	Mutación del sitio de corte y empalme IVS9 + 1G > T <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 3', Intrón 13 c.143513_1435-8del <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS13del-13(circunflejo sobre ( ))-8 <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 3', Intrón 16 c.20128T > G <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS16-8T > G <sup>14</sup>
65	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 18 c.21781G > T <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', Intrón 18 c.21781G > A <sup>5</sup>

ES 3 002 777 T3

	Mutación del sitio de corte y empalme 5', intrón 18 c.21781G > C <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 3', intrón 18 c.21792A > G <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS18 + 1G > A <sup>14</sup>
5	Mutación del sitio de corte y empalme 5', intrón 19 c.2343 + 1G > T <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', intrón 19 c.2343 + 2T > C <sup>5</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS19 + 2T > C <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS19 + 1G > A <sup>22</sup>
10	Mutación del sitio de corte y empalme 3', intrón 21 c.26112A > T <sup>5</sup>
	IVS22+3A>G <sup>55</sup>
	IVS 23-8 G-A <sup>56</sup>
	IVS24+5G>A <sup>51</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme 5', intrón 24 c.32131delG <sup>5</sup>
15	IVS35-6C>G <sup>55</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 1198-1G > C <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 1810-3C > G <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 2178 + 1G > A <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 2344-1G > T <sup>17</sup>
20	Mutación de corte y empalme putativo c.2611-2A > T <sup>55</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 3213 + 1_3213 + 2delinsA <sup>17</sup>
	c.-24C>A <sup>44,78</sup>
	c.7613G>T <sup>9</sup>
	c.77-19T>A <sup>52</sup>
25	c.90_93delGAAA <sup>18</sup>
	c.124G>A <sup>55</sup>
	c.150+3A>C <sup>15</sup>
	174C>T <sup>54</sup>
	c.245T>C <sup>37</sup>
30	c.249_250insT <sup>13</sup>
	270T>C <sup>54</sup>
	402C>T <sup>54</sup>
	585G>C <sup>54</sup>
35	c.611+1G>A <sup>70</sup>
	c.811+4A>G <sup>56</sup>
	c.612-15_8del10bp <sup>55</sup>
	c.625A>C <sup>51</sup>
	c.627+5G>T <sup>51</sup>
40	c.625A>C/c.627+5G>T <sup>51</sup>
	696G>T <sup>54</sup>
	c.784+1G>C <sup>45</sup>
	807T>C <sup>54</sup>
	c.886C>T <sup>51</sup>
45	c.890A>G <sup>55</sup>
	c.908+1G>A <sup>57</sup>
	c.908+5G>A <sup>55</sup>
	c.908delG <sup>55</sup>
	c.909-15A>G <sup>56</sup>
50	957A>G <sup>54</sup>
	c.1084-2A>G <sup>57</sup>
	11451bpdeletion <sup>50</sup>
	1281C>T <sup>54,57</sup>
55	c.1309-165C>T <sup>15</sup>
	c.1434+174G>A <sup>13</sup>
	c.1434+70C>T <sup>13</sup>
	c.1530C>A <sup>57</sup>
	c.1587-1589delCTT <sup>51</sup>
60	c.1621A>C <sup>30,58</sup>
	c.1638+32T>C <sup>56</sup>
	c.1838+80C>T <sup>55</sup>
	1671C>T <sup>54</sup>
	1791G>T <sup>54</sup>
	1939delA <sup>14</sup>
65	c.2075+3A>G <sup>55</sup>
	c.2081T>A <sup>51</sup>

	c.2093G>A <sup>65</sup>
	2098delA <sup>16</sup>
	c.2138-8T>G <sup>67</sup>
5	2142A>G <sup>54</sup>
	c.2178+1G>T <sup>36,36</sup>
	c.2179-17C>A <sup>66</sup>
	c.2344-157T>G <sup>68</sup>
	c.2344-17T>C <sup>66</sup>
10	c.2417G>A <sup>78</sup>
	c.2541delG <sup>67</sup>
	c.2620C>T <sup>32,33</sup>
	c.2815-8A>G <sup>58</sup>
	c.3003A>G <sup>37</sup>
15	c.3084A>G <sup>48,54</sup>
	c.3213+4A>G <sup>9,37</sup>
	c.3213+5G>A <sup>9</sup>
	c.3268C>T <sup>78</sup>
20	3285A>G <sup>54</sup>
	c.3382C>T <sup>75</sup>
	3435A>G <sup>54</sup>
	c.3491delT <sup>72</sup>
	c.3589C>T <sup>57</sup>
25	c.3765(+1+5)del5 <sup>42</sup>
	c.3766-34A>G <sup>66</sup>
	c.3787-3788insC <sup>8</sup>
	c.3770delA <sup>67</sup>
	c.3826C>T <sup>72</sup>
30	c.3846C>T <sup>57</sup>
	c.3929delG <sup>67</sup>
	c.*236A>G <sup>66</sup>
	1145delC <sup>2</sup>
35	Ex13 Ex17del <sup>82</sup>

**Tabla 5.**  
**Mutaciones seleccionadas de ABCB11 asociadas con PFIC-2**

40	Posición de aminoácido 1 (p. ej., M1V) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 4 (p. ej., S4X) <sup>64</sup>
	Posición de aminoácido 19 (p. ej., G19R) <sup>66</sup>
	Posición de aminoácido 25 (p. ej., S25X) <sup>14</sup>
	Posición de aminoácido 26 (p. ej., Y26fs*7) <sup>68</sup>
45	Posición de aminoácido 50 (p. ej., L50S) <sup>7,57</sup>
	Posición de aminoácido 52 (p. ej., R52W) <sup>66</sup>
	Posición de aminoácido 58 (p. ej., D58N) <sup>52</sup>
	Posición de aminoácido 62 (p. ej., M62K) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 66 (p. ej., S66N) <sup>17</sup>
50	Posición de aminoácido 68 (p. ej., C68Y) <sup>41</sup>
	Posición de aminoácido 93 (p. ej., Y93S) <sup>13</sup>
	Posición de aminoácido 101 (p. ej., Q101Dfs*8) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 107 (p. ej., C107R) <sup>39</sup>
	Posición de aminoácido 112 (p. ej., I112T) <sup>9</sup>
55	Posición de aminoácido 114 (p. ej., W114R) <sup>2,6</sup>
	Posición de aminoácido 129 (p. ej., C129Y) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 135 (p. ej., E135K <sup>13</sup> , E135L <sup>17</sup> )
	Posición de aminoácido 167 (p. ej., A167V <sup>7</sup> , A167T <sup>1,17</sup> )
60	Posición de aminoácido 182 (p. ej., I182K) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 183 (p. ej., M183V <sup>8</sup> , M183T <sup>9</sup> )
	Posición de aminoácido 225 (p. ej., T225P) <sup>67</sup>
	Posición de aminoácido 226 (p. ej., S226L) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 232 (p. ej., L232Cfs*9) <sup>9</sup>
65	Posición de aminoácido 233 (p. ej., L233S) <sup>66</sup>
	Posición de aminoácido 238 (p. ej., G238V) <sup>2,7</sup>

	Posición de aminoácido 242 (p. ej., T242I) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 245 (p. ej., I245Tfs*26) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 256 (p. ej., A256G) <sup>8</sup>
5	Posición de aminoácido 260 (p. ej., G260D) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 284 (p. ej., V284L) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 297 (p. ej., E297G) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 303 (p. ej., R303K <sup>8</sup> , R303M <sup>63</sup> , R303fsX32 <sup>183</sup> )
10	Posición de aminoácido 304 (p. ej., Y304X) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 312 (p. ej., Q312H) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 313 (p. ej., R313S) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 314 (p. ej., W314X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 318 (p. ej., K318Rfs*26) <sup>29</sup>
15	Posición de aminoácido 327 (p. ej., G327E) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 330 (p. ej., V330X) <sup>24</sup>
	Posición de aminoácido 336 (p. ej., C336S) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 337 (p. ej., Y337H) <sup>21</sup>
	Posición de aminoácido 342 (p. ej., W342G) <sup>26</sup>
20	Posición de aminoácido 354 (p. ej., R354X) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 361 (p. ej., Q361X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 366 (p. ej., V366D) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 386 (p. ej., G386X) <sup>34</sup>
	Δ Posiciones de aminoácido 383-389 <sup>57</sup>
25	Posición de aminoácido 387 (p. ej., R387H) <sup>11</sup>
	Posición de aminoácido 390 (p. ej., A390P) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 410 (p. ej., G410D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 413 (p. ej., L413W) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 415 (p. ej., R415X) <sup>42</sup>
30	Posición de aminoácido 420 (p. ej., I420T) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 454 (p. ej., V454X) <sup>48</sup>
	Posición de aminoácido 455 (p. ej., G455E) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 461 (p. ej., K461E) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 463 (p. ej., T463I) <sup>7</sup>
35	Posición de aminoácido 466 (p. ej., Q466K) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 470 (p. ej., R470Q <sup>7</sup> , R470X <sup>9</sup> )
	Posición de aminoácido 472 (p. ej., Y472X <sup>14</sup> , Y472C <sup>21</sup> )
	Posición de aminoácido 475 (p. ej., C475X) <sup>33</sup>
40	Posición de aminoácido 481 (p. ej., V481E) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 482 (p. ej., D482G) <sup>47</sup>
	Posición de aminoácido 484 (p. ej., H484Rfs*5) <sup>8</sup>
	Posición de aminoácido 487 (p. ej., R487H <sup>2</sup> , R487P <sup>34</sup> )
	Posición de aminoácido 490 (p. ej., N490D) <sup>7</sup>
45	Posición de aminoácido 493 (p. ej., W493X) <sup>8</sup>
	Posición de aminoácido 498 (p. ej., I498T) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 501 (p. ej., V501G) <sup>68</sup>
	Posición de aminoácido 512 (p. ej., I512T) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 515 (p. ej., N515T <sup>7</sup> , N515D <sup>64</sup> )
50	Posición de aminoácido 516 (p. ej., I516M) <sup>17</sup>
	Posición de aminoácido 517 (p. ej., R517H) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 520 (p. ej., R520X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 523 (p. ej., A523G) <sup>19</sup>
	Posición de aminoácido 528 (p. ej., I528X) <sup>9</sup>
55	Posición de aminoácido 540 (p. ej., F540L) <sup>48</sup>
	Posición de aminoácido 541 (p. ej., I541L <sup>7</sup> , I541T <sup>17</sup> )
	Posición de aminoácido 548 (p. ej., F548Y) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 549 (p. ej., D549V) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 554 (p. ej., E554K) <sup>21</sup>
60	Posición de aminoácido 559 (p. ej., M559T) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 562 (p. ej., G562D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 570 (p. ej., A570T <sup>7</sup> , A570V <sup>26</sup> )
	Posición de aminoácido 575 (p. ej., R575X <sup>4</sup> , R575Q <sup>21</sup> )
	Posición de aminoácido 586 (p. ej., A586V) <sup>7</sup>
65	Posición de aminoácido 591 (p. ej., N591S) <sup>8,17</sup>
	Posición de aminoácido 593 (p. ej., S593R) <sup>2,7</sup>

	Posición de aminoácido 597 (p. ej., V597V <sup>9</sup> , V597L <sup>13</sup> )
	Posiciones de aminoácido 591 y 597 (p. ej., N591S + V597V) <sup>11</sup>
5	Posición de aminoácido 603 (p. ej., K603K) <sup>55</sup>
	Posición de aminoácido 609 (p. ej., H609Hfs*46) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 610 (p. ej., I610Gfs*45) <sup>3</sup>
	Posición de aminoácido 615 (p. ej., H615R) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 625 (p. ej., T625Nfs*5) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 627 (p. ej., I627T) <sup>7</sup>
10	Posición de aminoácido 636 (p. ej., E636G) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 669 (p. ej., I669V) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 698 (p. ej., R698H) <sup>9</sup>
	Posiciones de aminoácido 112 y 698 (p. ej., I112T + R698H) <sup>9</sup>
15	Posición de aminoácido 699 (p. ej., S699P) <sup>15</sup>
	Posición de aminoácido 766 (p. ej., G766R) <sup>24</sup>
	Posición de aminoácido 806 (p. ej., G806G) <sup>55</sup>
	Posición de aminoácido 824 (p. ej., G824E) <sup>42</sup>
	Posición de aminoácido 832 (p. ej., R832C <sup>7,26</sup> , R832H <sup>41</sup> )
20	Posición de aminoácido 842 (p. ej., D842G) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 859 (p. ej., T859R) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 865 (p. ej., A865V) <sup>45</sup>
	Posición de aminoácido 877 (p. ej., G877R) <sup>56</sup>
	Posición de aminoácido 893 (p. ej., A893V) <sup>57</sup>
25	Posición de aminoácido 901 (p. ej., S901R) <sup>17</sup>
	Posición de aminoácido 903 (p. ej., V903G) <sup>57</sup>
	Δ Posición de aminoácido 919 <sup>12</sup>
	Posición de aminoácido 928 (p. ej., R928X) <sup>16,21</sup>
	Posición de aminoácido 930 (p. ej., K930Efs*79 <sup>10</sup> , K930Efs*49 <sup>26</sup> )
30	Posición de aminoácido 949 (p. ej., R948C) <sup>7,26</sup>
	Posición de aminoácido 979 (p. ej., N979D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 982 (p. ej., G982R) <sup>2,7</sup>
	Posiciones de aminoácido 444 y 982 (p. ej., V444A + G982R) <sup>31</sup>
35	Posición de aminoácido 1001 (p. ej., R1001R) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 1003 (p. ej., G1003R) <sup>54</sup>
	Posición de aminoácido 1004 (p. ej., G1004D) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 1027 (p. ej., S1027R) <sup>23</sup>
	Posición de aminoácido 1028 (p. ej., A1028A) <sup>19</sup>
	Posición de aminoácido 1032 (p. ej., G1032R) <sup>12</sup>
40	Posición de aminoácido 1041 (p. ej., Y1041X) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 1050 (p. ej., R1050C) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 1053 (p. ej., Q1053X) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 1055 (p. ej., L1055P) <sup>26</sup>
45	Posición de aminoácido 1057 (p. ej., R1057X) <sup>2</sup>
	Posición de aminoácido 1058 (p. ej., Q1058Hfs*38 <sup>9</sup> , Q1058fs*39 <sup>17</sup> )
	Posición de aminoácido 1061 (p. ej., I1061Vfs*34) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 1063 (p. ej., C1063Y) <sup>47</sup>
	Posición de aminoácido 1090 (p. ej., R1090X) <sup>2</sup>
50	Posición de aminoácido 1099 (p. ej., L1099Lfs*38) <sup>26</sup>
	Posición de aminoácido 1100 (p. ej., S1100Qfs*38) <sup>13</sup>
	Posición de aminoácido 1110 (p. ej., A1110E) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1116 (p. ej., G1116R <sup>7</sup> , G1116F <sup>9,17</sup> , G1116E <sup>36</sup> )
	Posición de aminoácido 1128 (p. ej., R1128C) <sup>7,13</sup>
55	Posición de aminoácido 1131 (p. ej., D1131V) <sup>27</sup>
	Posición de aminoácido 1144 (p. ej., S1144R) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1153 (p. ej., R1153C <sup>2,7</sup> , R1153H <sup>7,26</sup> )
	Posición de aminoácido 1154 (p. ej., S1154P) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1173 (p. ej., N1173D) <sup>57</sup>
60	Posición de aminoácido 1192 (p. ej., A1192Efs*50) <sup>9</sup>
	Posición de aminoácido 1198 (p. ej., H1198R) <sup>57</sup>
	Posición de aminoácido 1210 (p. ej., T1210P <sup>7</sup> , T1210F <sup>57</sup> )
	Posición de aminoácido 1211 (p. ej., N1211D) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1212 (p. ej., V1212F) <sup>26</sup>
65	Posición de aminoácido 1231 (p. ej., R1231W <sup>7</sup> , R1223Q <sup>7</sup> )
	Posición de aminoácido 1232 (p. ej., A1232D) <sup>17</sup>

	Posición de aminoácido 1235 (p. ej., R1235X) <sup>12</sup>
	Posición de aminoácido 1242 (p. ej., L1242I) <sup>7</sup>
	Posición de aminoácido 1256 (p. ej., T1256fs*1296) <sup>83</sup>
5	Posición de aminoácido 1268 (p. ej., R1268Q) <sup>2,7</sup>
	Posición de aminoácido 1302 (p. ej., E1302X) <sup>87</sup>
	Posición de aminoácido 1311 (p. ej., Y1311X) <sup>97</sup>
	Posición de aminoácido 1316 (p. ej., T1316Lfs*64) <sup>15</sup>
	Intrón 4 ((+3)A > C) <sup>1</sup>
10	Mutación del sitio de corte y empalme IVS7 + 1G > A <sup>14</sup>
	IVS8 + 1G > C <sup>75</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS9 + 1G > T <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS13del-13(circunflejo sobre ( ))-8 <sup>14</sup>
15	Mutación del sitio de corte y empalme IVS16-8T > G <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS18 + 1G > A <sup>14</sup>
	Mutación del sitio de corte y empalme IVS19 + 2T > C <sup>14</sup>
	IVS 23-8 G-A <sup>36</sup>
	IVS24 + 5G > A <sup>51</sup>
20	Mutación de corte y empalme putativo 1198-1G > C <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 1810-3C > G <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 2178 + 1G > A <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 2344-1G > T <sup>17</sup>
	Mutación de corte y empalme putativo 3213 + 1 3213 + 2delinsA <sup>17</sup>
25	c.-24C > A <sup>78</sup>
	c.76 13 G > T <sup>9</sup>
	c.77-19T > A <sup>62</sup>
	c.90 93delGAAA <sup>18</sup>
	c.124G > A <sup>68</sup>
30	c 150 + 3 A > C <sup>10</sup>
	c.249 250insT <sup>18</sup>
	c.611 + 1G > A <sup>84</sup>
	c.611 + 4A > G <sup>38</sup>
	c.612-15 -6del10bp <sup>85</sup>
35	c.625A > C <sup>31</sup>
	c.627 + 5G > T <sup>31</sup>
	c.625A > C/c.627 + 5G > T <sup>31</sup>
	c.866C > T <sup>31</sup>
	c.890A > G <sup>89</sup>
40	c.908 + 1G > A <sup>57</sup>
	c.908 + 5G > A <sup>55</sup>
	c.908delG <sup>59</sup>
	delección 1273 1 bp <sup>91</sup>
45	c 1084-2A > G <sup>37</sup>
	c.1445A > G <sup>59</sup>
	c.1587-1589delCTT <sup>31</sup>
	c.1621A > C <sup>58</sup>
	1939delA <sup>14</sup>
50	c.2081T > A <sup>31</sup>
	2098delA <sup>16</sup>
	c.2343 + 1 G > T <sup>80</sup>
	c 2178 + 1G > T <sup>36</sup>
	c.2417G > A <sup>78</sup>
55	c.2620C > T <sup>32</sup>
	c.2815-8A > G <sup>55</sup>
	c.3003A > G <sup>37</sup>
	c.3213 + 4 A > G <sup>9,37</sup>
	c.3213 + 5 G > A <sup>9</sup>
60	c.3268C > T <sup>75</sup>
	c.3382C > T <sup>75</sup>
	c.3765(+1 + 5)del5 <sup>42</sup>
	c.3767-3768insC <sup>9</sup>
65	1145delC <sup>9</sup>
	Ex13 Ex17del <sup>82</sup>

<sup>A</sup> Una mutación a "X" denota un codón de parada temprano

*Referencias de las Tablas 4 y 5*

- 5 <sup>1</sup> Noe et al., J Hepatol. 2005, vol. 43, p. 3).  
<sup>2</sup> Lam et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2007, vol. 293(5), p. C1709-16.  
<sup>3</sup> Stindt et al., Liver Int. 2013, vol. 33, p. 10).  
<sup>4</sup> Gao et al., Shandong Yiyao 2012, vol. 52(10), p. 14-16.  
10 <sup>5</sup> Strautnieks et al., Gastroenterology. 2008, vol. 134, p. 4).  
<sup>6</sup> Kagawa et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008, vol. 294(1), p. G58-67.  
<sup>7</sup> Byrne et al., Hepatology. 2009, vol. 49, p. 2).  
<sup>8</sup> Chen et al., J Pediatr. 2008, vol. 153, p. 6).  
<sup>9</sup> Davit-Spraul et al., Hepatology 2010, vol. 51(5), p. 1645-1655.  
<sup>10</sup> Droge et al., Sci Rep. 2016, vol. 6: 24827.  
15 <sup>11</sup> Lang et al., Pharmacogenet Genomics. 2007, vol. 17, p. 1).  
<sup>12</sup> Ellinger et al., World J Gastroenterol. 2017, vol. 23, p. 29).  
<sup>13</sup> Vitale et al., J Gastroenterol. 2018, vol. 53(8), p. 945-958.  
<sup>14</sup> Knisely et al., Hepatology. 2006, vol. 44(2), p. 478-86.  
<sup>15</sup> Ellis et al., Hepatology. 2018, vol. 67, p. 4).  
20 <sup>16</sup> Lam et al., J Hepatol. 2006, vol. 44, p. 1).  
<sup>17</sup> Varma et al., Hepatology 2015, vol. 62(1), p. 198-206.  
<sup>18</sup> Treepongkaruna et al., World J Gastroenterol. 2009, vol. 15, p. 34).  
<sup>19</sup> Zarenezhad et al., Hepatitis Monthly: 2017, vol. 17(2); e43500.  
<sup>20</sup> Hayashi et al., Hepatol Res. 2016, vol. 46, p. 2).  
25 <sup>21</sup> Guorui et al., Linchuang Erke Zazhi 2013, vol. 31(10), 905-909.  
<sup>22</sup> van Mil et al., Gastroenterology. 2004, vol. 127, p. 2).  
<sup>23</sup> Anzivino et al., Dig Liver Dis. 2013, vol. 45, p. 3).  
<sup>24</sup> Park et al., World J Gastroenterol. 2016, vol. 22, p. 20).  
<sup>25</sup> Imagawa et al., J Hum Genet. 2018, vol. 63, p. 5).  
30 <sup>26</sup> Giovannoni et al., PLoS One. 2015, vol. 10(12): e0145021.  
<sup>27</sup> Hu et al., Mol Med Rep. 2014, vol. 10(3), p. 1264-1274.  
<sup>28</sup> Lang et al., Drug Metab Dispos. 2006, vol. 34, p. 9).  
<sup>29</sup> Masahata et al., Transplant Proc. 2016, vol. 48, p. 9).  
<sup>30</sup> Holz et al., Hepatol Commun. 2018, vol. 2, p. 2).  
35 <sup>31</sup> Li et al., Hepatology International 2017, vol. 11, N.º 1, Sup. Suplemento 1, pp. S180. Número de Resumen: OP284.  
<sup>32</sup> Francalanci et al., Laboratory Investigation 2011, vol. 91, Sup. SUPL. 1, pp. 360A. Número de Resumen: 1526.  
<sup>33</sup> Francalanci et al., Digestive and Liver Disease 2010, vol. 42, Sup. SUPL. 1, pp. S16. Número de Resumen: T.N.5.  
<sup>34</sup> Shah et al., J Pediatr Genet. 2017, vol. 6, p. 2).  
<sup>35</sup> Gao et al., Hepatitis Monthly 2017, vol. 17(10), e55087/l-e55087/6.  
40 <sup>36</sup> Evason et al., Am J Surg Pathol. 2011, vol. 35, p. 5).  
<sup>37</sup> Davit-Spraul et al., Mol Genet Metab. 2014, vol. 113, p. 3).  
<sup>38</sup> Maggiore et al., J Hepatol. 2010, vol. 53, p. 5).  
<sup>39</sup> McKay et al., Version 2. FIOORes. 2013; 2: 32. DOI: 10.12688/fioorresearch.2-32.v2  
<sup>40</sup> Liu et al., Pediatr Int. 2013, vol. 55, p. 2).  
45 <sup>41</sup> Waisbourd-Zinman et al., Ann Hepatol. 2017, vol. 16, p. 3).  
<sup>42</sup> Griffin, et al., Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology 2016, vol. 2016. Número de Resumen: A200. Info. Reunión: 2016 Canadian Digestive Diseases Week, CDDW 2016. Montreal, Q.C, Estados Unidos. 26 feb 2016-29 feb 2016  
<sup>43</sup> Qiu et al., Hepatology 2017, vol. 65(5), p. 1655-1669.  
50 <sup>44</sup> Imagawa et al., Sci Rep. 2017, 7:41806.  
<sup>45</sup> Kang et al., J Pathol Transl Med. 2019 May 16. doi: 10.4132/jptm.2019.05.03. [Epub antes de impresión]  
<sup>46</sup> Takahashi et al., Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007, vol. 19, p. 11).  
<sup>47</sup> Shimizu et al., Am J Transplant. 2011, vol. 11, p. 2).  
<sup>48</sup> Krawczyk et al., Ann Hepatol. 2012, vol. 11, p. 5).  
55 <sup>49</sup> Sharma et al., BMC Gastroenterol. 2018, vol. 18(1), p. 107.  
<sup>50</sup> Sattler et al., Journal of Hepatology 2017, vol. 66, N.º 1, Suppl. S, pp. S177. Información de la reunión.: Congreso Internacional del Hígado / 52ª Reunión Anual de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado. Amsterdam, PAÍSES BAJOS. Del 19 al 23 de abril de 2017. European Assoc Study Liver.  
<sup>51</sup> Jung et al., J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007, vol. 44(4), p. 453-458.  
60 <sup>52</sup> Sciveres. Enfermedades Digestivas y Hepáticas 2010, vol. 42, Sup. SUPL. 5, pp. S329. Número de Resumen: CO18. Info. Reunión: XVII Congreso Nacional SIGENP. Pescara, Italia. 07 oct 2010-09 oct 2010  
<sup>53</sup> Sohn et al., Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2019, vol. 22, p. 2).  
<sup>54</sup> Ho et al., Pharmacogenet Genomics. 2010, vol. 20, p. 1).  
<sup>55</sup> Wang et al., Hepatol Res. 2018, vol. 48, p. 7).  
65 <sup>56</sup> Shaprio et al., J Hum Genet. 2010, vol. 55(5), p. 308-313.  
<sup>57</sup> Bounford. Universidad de Birmingham. Dissertation Abstracts International, (2016) Vol. 75, N.º 1C. N.º de pedido:

AAI10588329. ProQuest Dissertations & Theses.

<sup>58</sup> Stolz et al., *Aliment Pharmacol Ther.* 2019, vol. 49(9), p. 1195-1204.

<sup>59</sup> Jankowska et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014, vol. 58, p. 1).

5 <sup>60</sup> Kim. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2016, vol. 62, Sup. SUPL. 1; pp 620. Número de Resumen: H-P-045. Info. Reunión: 49ª Reunión Anual de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, ESPGHAN 2016. Atenas, Grecia. 25 de mayo de 2016-28 de mayo de 2016.

<sup>61</sup> Pauli-Magnus et al., *Hepatology* 2003, vol. 38, n° 4 Suppl. 1, pp. 518A. imprimir. Información de la reunión.: 54ª Reunión Anual de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas. Boston, MA, EE. UU. Del 24 al 28 de octubre de 2003. Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas.

10 <sup>62</sup> Li et al., *Hepatology International* 2017, vol. 11, N.º 1, Sup. Suplemento 1, pp. S362. Número de Resumen: PP0347. Info. Reunión: 26ª Conferencia Anual de la Asociación de Asia y el Pacífico para el Estudio del Hígado, APASL 2017. Shanghai, China. 15 feb 2017-19 feb 2017

<sup>63</sup> Rumbo et al., *Transplantation* 2018, vol. 102, n.º 7, Sup. Suplemento 1, pp. S848. Número de Resumen: P.752. Info. Reunión: 27th International Congress of The Transplantation Society, TTS 2018. Madrid, Spain. 30 jun 2018-05 jul 2018.

15 <sup>64</sup> Lee et al., *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2017, vol. 20, p. 2).

<sup>65</sup> Sherrif et al., *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2013, vol. 33, n.º 8, pp. 1266-1270.

<sup>66</sup> Blackmore et al., *J Clin Exp Hepatol.* 2013, vol. 3(2), p. 159-161.

<sup>67</sup> Matte et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010, vol. 51(4), p. 488-493.

20 <sup>68</sup> Lin et al., *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2018, vol. 20, p. 9).

<sup>69</sup> Harmanci et al., *Experimental and Clinical Transplantation* 2015, vol. 13, Sup. SUPL. 2; pp 76. Número de Resumen: P62. Info. Reunión: 1er Congreso de la Sociedad Turca Mundial de Trasplantes. Astana, Kazajstán. 20 de mayo de 2015-22 de mayo de 2015.

<sup>70</sup> Herbst et al., *Mol Cell Probes.* 2015, vol. 29, p. 5).

25 <sup>71</sup> Moghadamrad et al., *Hepatology.* 2013, vol. 57, p. 6).

<sup>72</sup> Holz et al., *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2016, vol. 54, N.º 8. Número de Resumen: KV275. Info. Reunión: Viszeralmedizin 2016, 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fur Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie -10. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft fur Allgemein- und Viszeralchirurgie. Hamburgo, Alemania. 21 sep 2016-24 sep 2016.

30 <sup>73</sup> Wang et al., *PLoS One.* 2016; vol. 11(4): e0153114.

<sup>74</sup> Hao et al., *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2017, vol. 10(3), p. 3480-3487.

<sup>75</sup> Arnell et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010, vol. 51, p. 4).

35 <sup>76</sup> Sharma et al., *Indian Journal of Gastroenterology* 2017, vol. 36, N.º 1, Sup. Suplemento 1, pp. A99. Número de Resumen: M-20. Info. Reunión: 58ª Conferencia Anual de la Sociedad India de Gastroenterología, ISGCON 2017. Bhubaneswar, India. 14 dic 2017-17 dic 2017.

<sup>77</sup> Beausejour et al., *Can J Gastroenterol.* 2011, vol. 25, p. 6).

<sup>78</sup> Imagawa et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2016, vol. 63, Sup. Suplemento 2, pp. 551. Número de Resumen: 166. Info. Reunión: World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2016. Montreal, QC, Canada. 05 oct 2016-08 oct 2016.

40 <sup>79</sup> Peng et al., *Zhonghua er ke za zhi (Revista china de pediatría)* 2018, vol. 56, n.º 6, pp. 440-444.

<sup>80</sup> Tibesar et al., *Case Rep Pediatr.* 2014, vol. 2014: 185923.

<sup>81</sup> Ng et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2018, vol. 66, Sup. Suplemento 2, pp. 860. Número de Resumen: H-P-127. Info. Reunión: 51ª Reunión Anual Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, ESPGHAN 2018. Geneva, Switzerland. 09 de mayo de 2018-12 de mayo de 2018.

45 <sup>82</sup> Wong et al., *Clin Chem.* 2008, vol. 54, p. 7).

<sup>83</sup> Pauli-Magnus et al., *J Hepatol.* 2005, vol. 43(2), p. 342-357.

<sup>84</sup> Jericho et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 60, vol. 3, p. 368-374).

50 <sup>85</sup> Scheimann et al., *Gastroenterology* 2007, vol. 132, N.º 4, Suppl. 2, pp. A452. Información de la reunión.: Reunión de la Semana de las Enfermedades Digestivas/108ª Reunión Anual de la Asociación Americana de Gastroenterología. Washington, DC, EE. UU. (19 de mayo de 24). Amer Gastroenterol Assoc; Amer Assoc Study Liver Dis; Amer Soc Gastrointestinal Endoscopy; Soc Surg Alimentary Tract.

<sup>86</sup> Jaquotot-Haerranz et al., *Rev Esp Enferm Dig.* 2013, vol. 105, p. 1).

<sup>87</sup> Khosla et al., *American Journal of Gastroenterology* 2015, vol. 110, N.º Suppl. 1, pp. S397. Información de la reunión.: 80ª Reunión Científica Anual del Colegio Americano de Gastroenterología. Honolulu, HI, EE. UU. Del 16 al 21 de octubre de 2015.

55 <sup>88</sup> Droge et al., *J Hepatol.* 2017, vol. 67(6), p. 1253-1264.

<sup>89</sup> Liu et al., *Liver International* 2010, vol. 30(6), p. 809-815.

<sup>90</sup> Chen et al., *Journal of Pediatrics* 2002, vol. 140(1), p. 119-124.

<sup>91</sup> Patente de EE. UU. N.º 9.295.677.

60 En algunas realizaciones, la mutación en ABCB11 se selecciona entre A167T, G238V, V284L, E297G, R470Q, R470X, D482G, R487H, A570T, N591S, A865V, G982R, R1153C y R1268Q.

65 En el presente documento se describen métodos para tratar la PFIC (p. ej., PFIC-1 y PFIC-2) en un sujeto que incluyen realizar un ensayo en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una mutación asociada con la PFIC (p. ej., una mutación ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, NR1H4 o Myo5b), y administrar (p. ej., administrar específica

o selectivamente) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto que se ha determinado que tiene una mutación asociada con la FICP. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación ATP8B1 o ABCB11. Por ejemplo, una mutación como la proporcionada en cualquiera de las Tablas 1-4. En algunas realizaciones, la mutación en ATP8B1 se selecciona entre L127P, G308V, T456M, D554N, F529del, I661T, E665X, R930X, R952X, R1014X y G1040R. En algunas realizaciones, la mutación en ABCB11 se selecciona entre A167T, G238V, V284L, E297G, R470Q, R470X, D482G, R487H, A570T, N591S, A865V, G982R, R1153C y R1268Q.

También se divulgan métodos para tratar la PFIC (p. ej., PFIC-1 y PFIC-2) en un sujeto que la necesite, comprendiendo el método: (a) detectar una mutación asociada con la PFIC (p. ej., una mutación ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, NR1H4 o Myo5b) en el sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (I) de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, los métodos para tratar la PFIC pueden incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un sujeto que tenga una mutación asociada con la PFIC (p. ej., una mutación ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, NR1H4 o Myo5b). En algunas realizaciones, la mutación es una mutación ATP8B1 o ABCB11. Por ejemplo, una mutación como la proporcionada en cualquiera de las Tablas 1-4. En algunas realizaciones, la mutación en ATP8B1 se selecciona entre L127P, G308V, T456M, D554N, F529del, I661T, E665X, R930X, R952X, R1014X y G1040R. En algunas realizaciones, la mutación en ABCB11 se selecciona entre A167T, G238V, V284L, E297G, R470Q, R470X, D482G, R487H, A570T, N591S, A865V, G982R, R1153C y R1268Q.

En algunas realizaciones, se determina que el sujeto tiene una mutación asociada con PFIC en un sujeto o en una muestra de biopsia del sujeto mediante el uso de cualquier prueba reconocida en el arte, incluida la secuenciación de próxima generación (NGS). En algunas realizaciones, se determina que el sujeto tiene una mutación asociada con la PFIC utilizando una prueba o ensayo aprobado por una agencia reguladora, p. ej., la FDA, para identificar una mutación asociada con la PFIC en un sujeto o una muestra de biopsia del sujeto, o realizando cualquiera de los ejemplos no limitantes de ensayos descritos en el presente documento. Otros métodos de diagnóstico de la PFIC se describen en Gunaydin, M. et al., *Hepat Med.* 2018, vol. 10, p. 95-104).

En algunas realizaciones, el tratamiento de PFIC (p. ej., PFIC-1 o PFIC-2) disminuye el nivel de ácidos biliares séricos en el sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos se determina mediante, por ejemplo, un ensayo enzimático ELISA o los ensayos para la medición de ácidos biliares totales descritos en Danese et al., *PLoS One.* 2017, vol. 12(6): e0179200. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos puede disminuir, por ejemplo, del 10% al 40%, del 20% al 50%, del 30% al 60%, del 40% al 70%, del 50% al 80%, o en más del 90% del nivel de ácidos biliares séricos antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el tratamiento de la PFIC incluye el tratamiento del prurito.

Dado que el LBAT se expresa en los hepatocitos, las sustancias inhibitoras del LBAT y del ASBT/LBAT dual deben tener al menos cierta biodisponibilidad y fracción libre en sangre. Dado que los compuestos inhibitoras de LBAT sólo necesitan sobrevivir desde el intestino hasta el hígado, se espera que una exposición sistémica relativamente baja de dichos compuestos sea suficiente, minimizando así el riesgo potencial de cualquier efecto secundario en el resto del organismo. Se espera que la inhibición de LBAT y ASBT tenga al menos efectos aditivos en la disminución de la concentración intrahepática de ácidos biliares. También se espera que un inhibidor dual de ASBT/LBAT pueda reducir los niveles de ácidos biliares sin inducir diarrea, como se observa a veces con los inhibidores de ASBT.

Se espera que los compuestos que tienen una alta potencia inhibitora de LBAT y suficiente biodisponibilidad sean particularmente adecuados para el tratamiento de la hepatitis. Se espera que los compuestos que tengan una potencia inhibitora dual ASBT/LBAT y una biodisponibilidad suficiente sean especialmente adecuados para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

La NASH es una enfermedad hepática crónica común y grave que se asemeja a la enfermedad hepática alcohólica, pero que ocurre en personas que beben poco o nada de alcohol. En los pacientes con NASH, la acumulación de grasa en el hígado, conocida como enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o esteatosis, y otros factores como el colesterol LDL elevado y la resistencia a la insulina inducen una inflamación crónica en el hígado y pueden provocar una cicatrización progresiva del tejido, conocida como fibrosis, y cirrosis, seguida finalmente de insuficiencia hepática y muerte. Se ha observado que los pacientes con NASH presentan concentraciones séricas totales de ácidos biliares significativamente más elevadas que los sujetos sanos en ayunas (aumento de 2,2 a 2,4 veces en NASH) y en todos los momentos posprandiales (aumento de 1,7 a 2,2 veces en NASH). Estos son impulsados por el aumento de los ácidos biliares primarios y secundarios conjugados con taurina y glicina. Los pacientes con NASH mostraron una mayor variabilidad en su perfil de ácidos biliares en ayunas y postprandial. Estos resultados indican que los pacientes con NASH tienen una mayor exposición en ayunas y postprandial a los ácidos biliares, incluidas las especies secundarias más hidrofóbicas y citotóxicas. El aumento de la exposición a los ácidos biliares puede estar implicado en la lesión hepática y la patogénesis de la NAFLD y la NASH (Ferslew et al., *Dig Dis Sci.* 2015, vol. 60, p. 3318-3328). Por lo tanto, es probable que la inhibición de ASBT y/o LBAT sea beneficiosa para el tratamiento de la NASH.

La NAFLD se caracteriza por esteatosis hepática sin causas secundarias de esteatosis hepática, incluido el consumo excesivo de alcohol, otras enfermedades hepáticas conocidas o el uso a largo plazo de un medicamento esteatogénico

(Chalasani et al., Hepatology 67, vol. 1(328-357), p. 328-357). La NAFLD puede clasificarse en hígado graso no alcohólico (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Según Chalasani et al., la NAFL se define como la presencia de > 5% de esteatosis hepática sin evidencia de lesión hepatocelular en forma de abombamiento de los hepatocitos. La NASH se define como la presencia de > 5% de esteatosis hepática e inflamación con lesión de los hepatocitos (p. ej., abombamiento), con o sin fibrosis hepática. La NASH también suele asociarse a inflamación hepática y fibrosis hepática, que pueden evolucionar a cirrosis, enfermedad hepática terminal y carcinoma hepatocelular. Aunque la fibrosis hepática no siempre está presente en la NASH, la gravedad de la fibrosis, cuando está presente, puede estar relacionada con los resultados a largo plazo.

Existen muchos enfoques utilizados para valorar y evaluar si un sujeto padece NAFLD y, en caso afirmativo, la gravedad de la enfermedad, incluida la diferenciación de NAFLD entre NAFL o NASH. En algunas realizaciones, la gravedad de la NAFLD puede evaluarse utilizando el NAS. En algunas realizaciones, el tratamiento de la NAFLD puede evaluarse utilizando el NAS. En algunas realizaciones, el NAS puede determinarse como se describe en Kleiner et al., Hepatology. 2005, 41(6):1313-1321. Véase, por ejemplo, la Tabla 6 para un esquema simplificado de NAS adaptado de Kleiner.

**Tabla 6. Ejemplo de puntuación de actividad de NAFLD (NAS) con estadio de fibrosis**

Característica	Grado	Puntuación
Esteatosis	<5%	0
	5-33%	1
	>33-66%	2
	>66%	3
Inflamación Lobular	Sin focos	0
	<2 focos/200x	1
	2-4 focos/200x	2
	>4 focos/200x	3
Degeneración globular	Ninguna	0
	Pocas	1
	Muchas células/Dilatación Prominente	2
Fibrosis	Ninguna	0
	Perisinusoidal o periportal	1
	Perisinusoidal y portal/periportal	2
	Fibrosis en puente	3
	Cirrosis	4

En algunas realizaciones, NAS se determina de forma no invasiva, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2018/0140219. En algunas realizaciones, el NAS se determina para una muestra del sujeto antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el NAS se determina durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, una puntuación NAS más baja durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo indica el tratamiento de NAFLD (p. ej., NASH). p. ej., una disminución del NAS en 1, en 2, en 3, en 4, en 5, en 6 o en 7 indica tratamiento de NAFLD (p. ej., NASH). En algunas realizaciones, el NAS tras la administración de un compuesto de la invención, o una

- sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 7 o menos. En algunas realizaciones, el NAS durante el período de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, el NAS durante el período de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 7 o menos. En algunas realizaciones, el NAS durante el período de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, el NAS tras el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 7 o menos. En algunas realizaciones, el NAS tras el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.
- Enfoques adicionales de valoración y evaluación de NASH en un sujeto incluyen la determinación de uno o más de esteatosis hepática (p. ej., acumulación de grasa en el hígado); inflamación hepática; biomarcadores indicativos de uno o más de daño hepático, inflamación hepática, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática (p. ej., marcadores séricos y paneles). Otros ejemplos de indicadores fisiológicos de NASH pueden incluir la morfología hepática, la rigidez hepática y el tamaño o peso del hígado del sujeto.
- En algunas realizaciones, NASH en el sujeto se evidencia por una acumulación de grasa hepática y la detección de un biomarcador indicativo de daño hepático. Por ejemplo, la ferritina sérica elevada y los títulos bajos de autoanticuerpos séricos pueden ser características comunes de la NASH.
- En algunas realizaciones, los métodos para evaluar la NASH incluyen imágenes por resonancia magnética, ya sea por espectroscopia o por fracción grasa de densidad de protones (MRI-PDFF) para cuantificar la esteatosis, elastografía transitoria (FIBROSCAN®), gradiente de presión venosa hepática (HPVG), medición de la rigidez hepática con MRE para diagnosticar fibrosis hepática significativa y/o cirrosis, y evaluar las características histológicas de la biopsia hepática. En algunas realizaciones, la resonancia magnética se utiliza para detectar una o varias esteatohepatitis (NASH-RM), fibrosis hepática (Fibro-RM) y esteatosis. Véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. 2016/146715 y 2005/0215882.
- En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH puede incluir una disminución de uno o más síntomas asociados con la NASH; una reducción de la cantidad de esteatosis hepática; una disminución de la NAS; una disminución de la inflamación hepática; una disminución del nivel de biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática; y una reducción de la fibrosis y/o cirrosis, una ausencia de progresión adicional de la fibrosis y/o cirrosis, o una ralentización de la progresión de la fibrosis y/o cirrosis en el sujeto tras la administración de una o más dosis de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- En algunas realizaciones, el tratamiento de NASH comprende una disminución de uno o más síntomas asociados con NASH en el sujeto. Algunos síntomas pueden ser: aumento del tamaño del hígado, fatiga, dolor en la parte superior derecha del abdomen, hinchazón abdominal, aumento del tamaño de los vasos sanguíneos bajo la superficie de la piel, aumento del tamaño de los senos en los hombres, aumento del tamaño del bazo, palmas de las manos enrojecidas, ictericia y prurito. En algunas realizaciones, el sujeto es asintomático. En algunas realizaciones, el peso corporal total del sujeto no aumenta. En algunas realizaciones, el peso corporal total del sujeto disminuye. En algunas realizaciones, el índice de masa corporal (BMI) del sujeto no aumenta. En algunas realizaciones, el índice de masa corporal (BMI) del sujeto disminuye. En algunas realizaciones, la proporción de cintura y cadera (WTH) del sujeto no aumenta. En algunas realizaciones, la proporción de cintura y cadera (WTH) del sujeto disminuye.
- En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH puede evaluarse midiendo la esteatosis hepática. En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH comprende una reducción de la esteatosis hepática tras la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la esteatosis hepática se determina mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en ultrasonografía, tomografía computarizada (TC), resonancia magnética, espectroscopia por resonancia magnética (ERM), elastografía por resonancia magnética (ERM), elastografía transitoria (ET) (p. ej., FIBROSCAN®), medición del tamaño o peso del hígado, o mediante biopsia hepática (véase, p. ej., Di Lascio et al., *Ultrasound Med Biol.* 2018, vol. 44(8), p. 1585-1596; Lv et al., *J Clin Transl Hepatol.* 2018, vol. 6(2), p. 217-221; Reeder et al., *J Magn Reson Imaging.* 2011, vol. 34(4), spcone; and de Ledinghen V, et al., *J Gastroenterol Hepatol.* 2016, vol. 31(4), p. 848-855. Un sujeto diagnosticado con NASH puede tener más de un 5% de esteatosis hepática, por ejemplo, más de un 5% a un 25%, de un 25% a un 45%, de un 45% a un 65%, o más de un 65% de esteatosis hepática. En algunas realizaciones, un sujeto con más de un 5% a un 33% de esteatosis hepática tiene un estadio 1 de esteatosis hepática, un sujeto con más de un 33% a un 66% de esteatosis hepática tiene un estadio 2 de esteatosis hepática, y un sujeto con más de un 66% de esteatosis hepática tiene un estadio 3 de esteatosis hepática.
- En algunas realizaciones, la cantidad de esteatosis hepática se determina antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la cantidad de esteatosis hepática se determina durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, una reducción de la cantidad de esteatosis hepática durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, indica el tratamiento de la NASH. Por ejemplo, una reducción de la cantidad de esteatosis hepática de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50%,

de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 75% o de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100% indica el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, una reducción de la cantidad de esteatosis hepática de alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 15%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90% o alrededor del 95% indica el tratamiento de la NASH.

En algunas realizaciones, la presencia de inflamación hepática se determina mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en biomarcadores indicativos de inflamación hepática y una muestra o muestras de biopsia hepática del sujeto. En algunas realizaciones, la gravedad de la inflamación hepática se determina a partir de una(s) muestra(s) de biopsia hepática del sujeto. Por ejemplo, la inflamación hepática en una muestra de biopsia hepática puede evaluarse como se describe en Kleiner et al., *Hepatology* 2005, vol. 41(6), p. 1313-1321 y Brunt et al., *Am J Gastroenterol* 1999, vol. 94, p. 2467-2474. En algunas realizaciones, la gravedad de la inflamación hepática se determina antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la gravedad de la inflamación hepática se determina durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, una disminución de la gravedad de la inflamación hepática durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, indica el tratamiento de la NASH. Por ejemplo, una disminución de la gravedad de la inflamación hepática de alrededor del 1% a alrededor del 50%, de alrededor del 25% a alrededor del 75%, o de alrededor del 50% a alrededor del 100% indica el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, una disminución de la gravedad de la inflamación hepática de alrededor del 5%, alrededor del 10%, alrededor del 15%, alrededor del 20%, alrededor del 25%, alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90% o alrededor del 95% indica el tratamiento de la NASH.

En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH comprende el tratamiento de la fibrosis y/o cirrosis, p. ej., una disminución de la gravedad de la fibrosis, una ausencia de progresión adicional de la fibrosis y/o cirrosis, o una ralentización de la progresión de la fibrosis y/o cirrosis. En algunas realizaciones, la presencia de fibrosis y/o cirrosis se determina mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en elastografía transitoria (p. ej., FIBROSCAN®), marcadores no invasivos de fibrosis hepática y características histológicas de una biopsia hepática. En algunas realizaciones, la gravedad (p. ej., estadio) de la fibrosis se determina mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en elastografía transitoria (p. ej., FIBROSCAN®), un sistema de puntuación de la fibrosis, biomarcadores de la fibrosis hepática (p. ej., biomarcadores no invasivos) y gradiente de presión venosa hepática (HVPG). Ejemplos no limitantes de sistemas de puntuación de la fibrosis incluyen el sistema de puntuación de la fibrosis NAFLD (véase, p. ej., Angulo et al., *Hepatology* 2007, vol. 45(4), p. 846-54), el sistema de puntuación de la fibrosis en Brunt et al., *Am. J. Gastroenterol.* 1999, vol. 94, p. 2467-2474, el sistema de puntuación de la fibrosis de Kleiner et al., *Hepatology* 2005, vol. 41(6), p. 1313-1321, y el sistema de puntuación de la fibrosis ISHAK (véase Ishak et al., *J. Hepatol.* 1995, vol. 22, p. 696-699).

En algunas realizaciones, la gravedad de la fibrosis se determina antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la gravedad de la fibrosis se determina durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, una disminución de la gravedad de la fibrosis durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, indica el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, la disminución de la gravedad de la fibrosis, la ausencia de progresión adicional de la fibrosis y/o cirrosis, o la ralentización de la progresión de la fibrosis y/o cirrosis indican el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, la gravedad de la fibrosis se determina utilizando un sistema de puntuación como cualquiera de los sistemas de puntuación de fibrosis descritos en el presente documento, p. ej., la puntuación puede indicar el estadio de la fibrosis, p. ej., estadio 0 (sin fibrosis), estadio 1, estadio 2, estadio 3 y estadio 4 (cirrosis) (véase, p. ej., Kleiner et al.). En algunas realizaciones, una disminución del estadio de la fibrosis es una disminución de la gravedad de la fibrosis. Por ejemplo, una disminución de 1, 2, 3 o 4 estadios es una disminución de la gravedad de la fibrosis. En algunas realizaciones, una disminución del estadio, p. ej., del estadio 4 al estadio 3, del estadio 4 al estadio 2, del estadio 4 al estadio 1, del estadio 4 al estadio 0, del estadio 3 al estadio 2, del estadio 3 al estadio 1, del estadio 3 al estadio 0, del estadio 2 al estadio 1, del estadio 2 al estadio 0, o del estadio 1 al estadio 0 indica el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, el estadio de fibrosis disminuye del estadio 4 al estadio 3, del estadio 4 al estadio 2, del estadio 4 al estadio 1, del estadio 4 al estadio 0, del estadio 3 al estadio 2, del estadio 3 al estadio 1, del estadio 3 al estadio 0, del estadio 2 al estadio 1, del estadio 2 al estadio 0, o del estadio 1 al estadio 0 tras la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el estadio de fibrosis disminuye del estadio 4 al estadio 3, del estadio 4 al estadio 2, del estadio 4 al estadio 1, del estadio 4 al estadio 0, del estadio 3 al estadio 2, del estadio 3 al estadio 1, del estadio 3 al estadio 0, del estadio 2 al estadio 1, del estadio 2 al estadio 0, o del estadio 1 al estadio 0 durante el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el estadio de fibrosis disminuye del estadio 4 al estadio 3, del estadio 4 al estadio 2, del estadio 4 al estadio 1, del estadio 4 al estadio 0, del estadio 3 al estadio 2, del estadio 3 al estadio 1, del estadio 3 al estadio 0, del estadio 2 al estadio 1, del estadio 2 al estadio 0, o del estadio 1 al estadio 0 tras el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la presencia de NASH se determina mediante uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática o sistemas de puntuación de los mismos. En algunas realizaciones, la gravedad de la NASH se determina mediante uno o más biomarcadores indicativos de uno o más daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática o sistemas de puntuación de los mismos. El nivel del biomarcador puede determinarse, por ejemplo, midiendo, cuantificando y monitorizando el nivel de expresión del gen o ARNm que codifica el biomarcador y/o el péptido o proteína del biomarcador. Ejemplos no limitantes de biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática y/o sistemas de puntuación de los mismos incluyen el índice de relación aspartato aminotransferasa (AST) a plaquetas (APRI); la relación aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) (AAR); la puntuación FIB-4, que se basa en el APRI, los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y la edad del sujeto (véase, p. ej., McPherson et al, Gut 2010, vol. 59(9), p. 1265-9); ácido hialurónico; citocinas proinflamatorias; un panel de biomarcadores compuesto por  $\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT) combinado con la edad y el sexo del sujeto para generar una medida de la fibrosis y la actividad necroinflamatoria en el hígado (p. ej., FIBROTEST®, FIBROSURE®), un panel de biomarcadores compuesto por bilirrubina, gamma-glutamilttransferasa, ácido hialurónico,  $\alpha$ 2-macroglobulina combinado con la edad y el sexo del sujeto (p. ej., HEPASCOPE®, véase, p. ej., Adams et al., Clin. Chem. 2005, vol. 51(10), p. 1867-1873), y un panel de biomarcadores formado por el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, el ácido hialurónico y la  $\alpha$ 2-macroglobulina (p. ej., FIBROSPECT®); un panel de biomarcadores compuesto por el inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 (TIMP-1), el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) y el ácido hialurónico (HA) (p. ej., la puntuación de fibrosis hepática mejorada (ELF), véase, p. ej., Lichtinghagen R, et al., J Hepatol. 2013 Aug;59(2):236-42). En algunas realizaciones, la presencia de fibrosis se determina por uno o más de la puntuación FIB-4, un panel de biomarcadores consistente en  $\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT) combinado con la edad y el sexo del sujeto para generar una medida de la fibrosis y la actividad necroinflamatoria en el hígado (p. ej., FIBROTEST®, FIBROSURE®), un panel de biomarcadores compuesto por bilirrubina, gamma-glutamilttransferasa, ácido hialurónico,  $\alpha$ 2-macroglobulina combinado con la edad y el sexo del sujeto (p. ej., HEPASCOPE®, véase, p. ej., Adams et al., Clin. Chem. 2005, vol. 51(10), p. 1867-1873), y un panel de biomarcadores compuesto por el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, el ácido hialurónico y la  $\alpha$ 2-macroglobulina (p. ej., FIBROSPECT®); y un panel de biomarcadores compuesto por el inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 (TIMP-1), el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) y el ácido hialurónico (HA) (p. ej., la puntuación de fibrosis hepática mejorada (ELF)). En algunas realizaciones, el nivel de aspartato aminotransferasa (AST) no aumenta. En algunas realizaciones, el nivel de aspartato aminotransferasa (AST) disminuye. En algunas realizaciones, el nivel de alanina aminotransferasa (ALT) no aumenta. En algunas realizaciones, el nivel de alanina aminotransferasa (ALT) disminuye. En algunas realizaciones, el "nivel" de una enzima se refiere a la concentración de la enzima, p. ej., en sangre. Por ejemplo, el nivel de AST o ALT puede expresarse en Unidades/L.

En algunas realizaciones, la gravedad de la fibrosis se determina mediante uno o más de los siguientes parámetros: la puntuación FIB-4, un panel de biomarcadores compuesto por  $\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT) combinado con la edad y el sexo del sujeto para generar una medida de la fibrosis y la actividad necroinflamatoria en el hígado (p. ej., FIBROTEST®, FIBROSURE®), un panel de biomarcadores compuesto por bilirrubina, gamma-glutamilttransferasa, ácido hialurónico,  $\alpha$ 2-macroglobulina combinado con la edad y el sexo del sujeto (p. ej., HEPASCOPE®, véase, p. ej., Adams et al., Clin. Chem. 2005, vol. 51(10), p. 1867-1873), y un panel de biomarcadores compuesto por el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, el ácido hialurónico y la  $\alpha$ 2-macroglobulina (p. ej., FIBROSPECT®); y un panel de biomarcadores compuesto por el inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1 (TIMP-1), el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (PIIINP) y el ácido hialurónico (HA) (p. ej., la puntuación de fibrosis hepática mejorada (ELF)).

En algunas realizaciones, la inflamación hepática se determina por el nivel de biomarcadores de inflamación hepática, p. ej., citoquinas proinflamatorias. Entre los ejemplos no limitantes de biomarcadores indicativos de inflamación hepática se incluyen la interleucina-(IL) 6, la interleucina-(IL) 1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , el factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, la proteína C reactiva (PCR), el PAI-1 y las isoformas de colágeno como Colla1, Colla2 y Col4a1 (véase, p. ej., Neuman, et al., Can. J. Gastroenterol. Hepatol. 2014, vol. 28(11), p. 607-618 y Patente de EE. UU. N.º 9,872,844. La inflamación hepática también puede evaluarse mediante el cambio de la infiltración de macrófagos, p. ej., midiendo un cambio en el nivel de expresión de CD68. En algunas realizaciones, la inflamación hepática puede determinarse midiendo o controlando los niveles séricos o circulantes de una o más de las siguientes sustancias: interleucina (IL) 6, interleucina (IL) 1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y proteína C reactiva (CRP).

En algunas realizaciones, el nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de daño hepático, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática se determina para una muestra del sujeto antes de la administración de un

compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática se determina durante el periodo de tiempo o después del periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, una disminución del nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática durante el periodo de tiempo o tras el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con antes de la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, indica el tratamiento de la NASH. Por ejemplo, una disminución del nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática de al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 15%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos en un 40%, al menos en un 45%, al menos en un 50%, al menos en un 55%, al menos en un 60%, al menos en un 65%, al menos en un 70%, al menos en un 75%, al menos en un 80%, al menos en un 85%, al menos en un 90%, al menos en un 95%, o al menos en un 99% indica el tratamiento de la NASH. En algunas realizaciones, la disminución del nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática tras la administración del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática durante el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más biomarcadores indicativos de uno o más de los daños hepáticos, inflamación, fibrosis hepática y/o cirrosis hepática tras el periodo de tiempo de administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%.

En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH disminuye el nivel de ácidos biliares séricos en el sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos se determina mediante, por ejemplo, un ensayo enzimático ELISA o los ensayos para la medición de ácidos biliares totales descritos en Danese et al., PLoS One. 2017, vol. 12(6): e0179200. En algunas realizaciones, el nivel de ácidos biliares séricos puede disminuir, por ejemplo, del 10% al 40%, del 20% al 50%, del 30% al 60%, del 40% al 70%, del 50% al 80%, o en más del 90% del nivel de ácidos biliares séricos antes de la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la NASH es NASH con colestasis concomitante. En la colestasis, la liberación de bilis, incluidos los ácidos biliares, desde el hígado está bloqueada. Los ácidos biliares pueden dañar los hepatocitos (véase, p. ej., Perez MJ, Briz O. World J. Gastroenterol. 2009, vol. 15(14), p. 1677-1689) que probablemente provoque o incremente la progresión de la fibrosis (p. ej., cirrosis) y aumente el riesgo de carcinoma hepatocelular (véase, p. ej., Sorrentino P et al., Dig. Dis. Sci. 2005, vol. 50(6), p. 1130-1135 y Satapathy SK y Sanyal AJ. Semin. Liver Dis. 2015, vol. 35, p. 3). En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH incluye el tratamiento del prurito. En algunas realizaciones, el tratamiento de la NASH con colestasis concomitante incluye el tratamiento del prurito. En algunas realizaciones, un sujeto con NASH con colestasis concomitante presenta prurito.

En la Tabla 7 se proporcionan biomarcadores ejemplares para la NASH.

**Tabla 7. Biomarcadores de NASH ejemplares**

**Biomarcadores de Fibrosis Hepática**

- 5 Índice de la relación entre la aspartato aminotransferasa (AST) y las plaquetas (APR)
- Proporción de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) (AAR)
- Puntuación FIB-4<sup>1</sup>
- ácido hialurónico (2,5%),
- 10 Citocinas proinflamatorias
- Un panel que incluye  $\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT) combinada con la edad y el sexo del sujeto para generar una medida de la fibrosis y la actividad necroinflamatoria en el hígado
- 15 (p. ej., FIBROTEST<sup>®</sup>, FIBROSURE<sup>®</sup>)
- Un panel que incluye bilirrubina, gamma-glutamilttransferasa, ácido hialurónico,  $\alpha$ 2-macroglobulina combinada con la edad y el sexo del sujeto (p. ej., HEPASCORE<sup>®</sup>)
- Un panel que incluye el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, ácido hialurónico y  $\alpha$ 2-macroglobulina (p. ej., FIBROSPECT<sup>®</sup>)
- 20 Un panel que incluye el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), amino-propéptido terminal del procólageno de tipo III (PIIINP) y ácido hialurónico (AH) (p. ej., la puntuación de fibrosis hepática mejorada (ELF)<sup>5</sup>)

**Biomarcadores de inflamación hepática<sup>4,5</sup>**

- Interleucina-(IL) 6
- Interleucina-(IL) 1 $\beta$
- 30 Factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$
- Factor de crecimiento transformador (TGF)- $\beta$
- Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1
- Proteína C reactiva (PCR)
- 35 PAI-1
- Isoformas de colágeno (p. ej., Col1a1, Col1a2 y Col4a1)
- Cambio de la infiltración de macrófagos (p. ej., un cambio del nivel de expresión de CD68).

**Referencias de la Tabla 7**

- <sup>1</sup> McPherson et al., Gut. 2010, vol. 59, p. 9).
- <sup>2</sup> Adams, et al. Clin Chem. 2005, vol. 51, p. 10).
- <sup>3</sup> Lichtinghagen, et al. J Hepatol. 2013, vol. 59(2), p. 236-242.
- <sup>4</sup> Neuman, et al. Can J Gastroenterol Hepatol. 2014, vol. 28, p. 11).
- 45 <sup>5</sup> Patente de EE. UU. N.º 9.872.844.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden mostrar una mayor fracción libre en plasma. En algunas realizaciones, la fracción libre es superior a aproximadamente 0,2%, por ejemplo, superior a aproximadamente 0,4%, por ejemplo, superior a aproximadamente 0,6%, por ejemplo, superior a aproximadamente 0,8%, por ejemplo, superior a aproximadamente 1,0%, por ejemplo, superior a aproximadamente 1,25%, por ejemplo, superior a aproximadamente 1,5%, por ejemplo, superior a aproximadamente 1,75%, por ejemplo, superior a aproximadamente 2,0%, por ejemplo, superior a aproximadamente 2,5%, por ejemplo, superior a aproximadamente 3%, por ejemplo, superior a aproximadamente 4%, por ejemplo, superior a aproximadamente 5%, por ejemplo, superior a aproximadamente 7,5%.75%, superior al 2,0%, superior al 2,5%, superior al 3%, superior al 4%, superior al 5%, superior al 7,5%, superior al 10% o superior al 20%.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden excretarse en la orina. En algunas realizaciones, la fracción del compuesto que se excreta en la orina es mayor que aproximadamente el 0,2%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 0,4%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 0,6%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 0,8%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 1,0%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 2%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 3%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 5%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 7,5%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 10%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 15%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 20%, como por ejemplo mayor que aproximadamente el 30%, o como por ejemplo mayor que aproximadamente el 50%.

Tras la absorción desde el intestino, algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden circular a través de la circulación enterohepática. En algunas realizaciones, la fracción del compuesto que circula a través de la circulación enterohepática es superior a aproximadamente el 0,1%, tal como superior a aproximadamente el 0,2%, tal como superior a aproximadamente el 0,3%, tal como superior a aproximadamente el 0,5%, tal como superior a aproximadamente el 1,0%, tal como superior a aproximadamente el 1,5%.5%, superior al 2%, superior al 3%, superior al 5%, superior al 7%, superior al 10%, superior al 15%, superior al 20%, superior al 30% o superior al 50%.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden provocar la excreción renal de sales biliares. En algunas realizaciones, la fracción de ácidos biliares circulantes que se excreta por vía renal es superior a aproximadamente el 1 %, tal como superior a aproximadamente el 2 %, tal como superior a aproximadamente el 5 %, tal como superior a aproximadamente el 7 %, tal como superior a aproximadamente el 10 %, tal como superior a aproximadamente el 15 %, tal como superior a aproximadamente el 20 %, o tal como superior a aproximadamente el 25 %.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden mostrar una permeabilidad mejorada u óptima. La permeabilidad puede medirse en células Caco2, y los valores se dan como valores Papp (permeabilidad aparente) en cm/s. En algunas realizaciones, la permeabilidad es mayor que al menos aproximadamente  $0,1 \times 10^{-6}$  cm/s, tal como mayor que aproximadamente  $0,2 \times 10^{-6}$  cm/s, tal como mayor que aproximadamente  $0,4 \times 10^{-6}$  cm/s, tal como mayor que aproximadamente  $0,7 \times 10^{-6}$  cm/s, tal como mayor que aproximadamente  $1,0 \times 10^{-6}$  cm/s.  $0 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $2 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $3 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $7 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $10 \times 10^{-6}$  cm/s, por ejemplo superior a aproximadamente  $15 \times 10^{-6}$  cm/s.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden mostrar una biodisponibilidad mejorada u óptima. En algunas realizaciones, la biodisponibilidad oral es superior a aproximadamente el 5%, tal como superior a aproximadamente el 7%, tal como superior a aproximadamente el 10%, tal como superior a aproximadamente el 15%, tal como superior a aproximadamente el 20%, tal como superior a aproximadamente el 30%, tal como superior a aproximadamente el 40%, tal como superior a aproximadamente el 50%, tal como superior a aproximadamente el 60%, tal como superior a aproximadamente el 70% o tal como superior a aproximadamente el 80%. En otras realizaciones, la biodisponibilidad oral se sitúa entre el 10 y el 90%, por ejemplo, entre el 20 y el 80%, entre el 30 y el 70% o entre el 40 y el 60%.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser un sustrato para transportadores relevantes en el riñón.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden dar lugar a concentraciones de ácidos biliares en el intestino, el hígado y en el suero que no causan efectos gastrointestinales adversos.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden disminuir la concentración de ácidos biliares en el hígado sin causar trastornos gastrointestinales como la diarrea.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y "en tratamiento" se refieren a revertir, aliviar, retrasar la aparición o inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno, o uno o más síntomas de los mismos, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse después de que se hayan desarrollado uno o más síntomas. En otros casos, el tratamiento puede administrarse en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un individuo susceptible antes de la aparición de los síntomas (p. ej., a la luz de un historial de síntomas y/o a la luz de factores genéticos u otros factores de susceptibilidad). El tratamiento también puede continuar una vez resueltos los síntomas, por ejemplo para prevenir o retrasar su reaparición.

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la invención es, p. ej., una sal de adición de base de un compuesto de la invención que es suficientemente ácida, tal como una sal de metal alcalino (p. ej., una sal de sodio o potasio), una sal de metal alcalinotérreo (p. ej., una sal de calcio o magnesio), una sal de amonio, o una sal con una base orgánica que proporcione un catión fisiológicamente aceptable, por ejemplo una sal con metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxietyl)amina.

Algunos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden tener centros quirales y/o centros isoméricos geométricos (isómeros E y Z). Debe entenderse que la invención abarca todos los isómeros ópticos, diastereoisómeros e isómeros geométricos que poseen actividad inhibidora de ASBT y/o LBAT. La invención también abarca todas y cada una de las formas tautoméricas de los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que poseen actividad inhibidora de ASBT y/o LBAT. Ciertos compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden existir tanto en formas no solvatadas como solvatadas, tales como, por ejemplo, formas hidratadas. Debe entenderse que la invención abarca todas estas formas solvatadas que poseen actividad inhibidora de ASBT y/o LBAT.

- En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes pueden incluir, p. ej., cargas, aglutinantes, desintegrantes, deslizantes y lubricantes. En general, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de manera convencional utilizando excipientes convencionales.
- Ejemplos de cargas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fosfato dicálcico dihidratado, sulfato de calcio, lactosa (como lactosa monohidratada), sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, almidón seco, almidones hidrolizados y almidón pregelatinizado.
- Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (como sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas (como goma de acacia y goma tragacanto), alginato de sodio, derivados de celulosa (como hidroxipropilmetilcelulosa (o hipromelosa), hidroxipropilcelulosa y etilcelulosa) y polímeros sintéticos (como copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona (povidona)).
- Ejemplos de desintegrantes adecuados incluyen, entre otros, almidón seco, almidón modificado (como almidón (parcialmente) pregelatinizado, almidón glicolato de sodio y carboximetilalmidón de sodio), ácido algínico, derivados de la celulosa (como la carboximetilcelulosa sódica, la hidroxipropilcelulosa y la hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC)) y polímeros reticulados (como la carmelosa, la croscarmelosa sódica, la carmelosa cálcica y el PVP reticulado (crospovidona)).
- Ejemplos de deslizantes y lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerilo, sílice coloidal, dióxido de silicio acuoso, silicato de magnesio sintético, óxido de silicio granulado fino, almidón, lauril sulfato sódico, ácido bórico, óxido de magnesio, ceras (como la cera de carnauba), aceite hidrogenado, polietilenglicol, benzoato sódico, polietilenglicol y aceite mineral.
- La composición farmacéutica puede recubrirse convencionalmente con una o más capas de recubrimiento. También se contemplan capas de recubrimiento entérico o capas de recubrimiento para la liberación retardada o dirigida del compuesto de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Las capas de recubrimiento pueden comprender uno o más agentes de recubrimiento y, opcionalmente, plastificantes y/o pigmentos (o colorantes).
- Ejemplos de agentes de recubrimiento adecuados incluyen, entre otros, polímeros a base de celulosa (como etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (o hipromelosa), hidroxipropilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, succinato de acetato de celulosa, succinato de hidroxipropilmetilcelulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa), polímeros a base de vinilo (como el alcohol polivinílico) y polímeros a base de ácido acrílico y sus derivados (como los copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, los copolímeros de ácido metacrílico, los copolímeros de metacrilato de metilo, los copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, los copolímeros de ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico).
- Ejemplos de plastificantes adecuados incluyen, entre otros, citrato de trietilo, triacetato de glicerilo, citrato de tributilo, ftalato de dietilo, citrato de tributilo de acetilo, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo y polietilenglicol.
- Ejemplos de pigmentos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dióxido de titanio, óxidos de hierro (como óxidos de hierro amarillo, marrón, rojo o negro) y sulfato de bario.
- La composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para administración oral, para inyección parenteral (incluyendo inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular e intravascular), para administración tópica o para administración rectal. En una realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adecuada para la administración oral, como un comprimido o una cápsula.
- La dosis requerida para el tratamiento terapéutico o profiláctico dependerá de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, la edad y el peso del paciente y otros factores normalmente considerados por el médico tratante, al determinar el régimen apropiado y el nivel de dosificación para un paciente en particular.
- La cantidad del compuesto a administrar variará en función del paciente tratado, pudiendo oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal y unos 50 mg/kg de peso corporal al día. Una forma de dosis unitaria, como un comprimido o una cápsula, contendrá normalmente entre 1 y 250 mg de principio activo, p. ej., entre 1 y 100 mg, o entre 1 y 50 mg, o entre 1 y 20 mg, p. ej., entre 2,5 mg, 5 mg, 10 mg o 15 mg. La dosis diaria puede administrarse como dosis única o dividida en una, dos, tres o más dosis unitarias. Una dosis diaria administrada por vía oral de un modulador de ácidos biliares es preferiblemente de 0,1 a 250 mg, más preferiblemente de 1 a 100 mg, de 1 a 5 mg, de 1 a 10 mg, de 1 a 15 mg o de 1 a 20 mg.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento. La invención también se refiere al uso de un compuesto de la invención, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, como medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o prevención de cualquiera de las enfermedades aquí mencionadas.

#### 5 *Terapia Combinada*

En un aspecto de la invención, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con al menos otro agente terapéuticamente activo, como con uno, dos, tres o más agentes terapéuticamente activos. El compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el al menos otro agente terapéuticamente activo pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los agentes terapéuticamente activos que son adecuados para la combinación con los compuestos de la invención incluyen, agentes activos conocidos que son útiles en el tratamiento de cualquiera de las condiciones antes mencionadas, trastornos y enfermedades.

En una realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con otro inhibidor de ASBT. Los inhibidores de ASBT adecuados se describen en los documentos WO 93/16055, WO 94/18183, WO 94/18184, WO 96/05188, WO 96/08484, WO 96/16051, WO 97/33882, WO 98/03818, WO 98/07449, WO 98/40375, WO 99/35135, WO 99/64409, WO 99/64410, WO 00/47568, WO 00/61568, WO 00/38725, WO 00/38726, WO 00/38727, WO 00/38728, WO 00/38729, WO 01/66533, WO 01/68096, WO 02/32428, WO 02/50051, WO 03/020710, WO 03/022286, WO 03/022825, WO 03/022830, WO 03/061663, WO 03/091232, WO 03/106482, WO 2004/006899, WO 2004/076430, WO 2007/009655, WO 2007/009656, WO 2011/137135, WO 2019/234077, WO 2020/161216, WO 2020/161217, WO 2021/110883, WO 2021/110884, WO 2021/110885, WO 2021/110886, WO 2021/110887, DE 19825804, EP 864582, EP 489423, EP 549967, EP 573848, EP 624593, EP 624594, EP 624595, EP 624596, EP 0864582, EP 1173205, EP 1535913 y EP 3210977. Ejemplos particulares de inhibidores de ASBT adecuados incluyen 1,1-dioxo-3,3-dibutil-5-fenil-7-metil-8-(N-((R)-1'-fenil-1'-[N'-(carboximetil)carbamoil]metil}carbamoilmetoxi)-2,3,4,5-tetrahidro-1, 5-benzotiazepina (elobixibat) y 1,1-dioxo-3,3-dibutil-5-fenil-7-metil-8-(N-((R)-α-[N -((S)-1-carboxipropil) carbamoil]-4-hidroxibenzoil}carbamoilmetoxi)-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,5-benzotiadiazepina (odevixibat).

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un aglutinante de ácidos biliares (también denominado secuestrante de ácidos biliares o resina), como colesvelam, colestiramina o colestipol. En una realización preferida de dicha combinación, el aglutinante de ácidos biliares está formulado para su liberación en el colon. Ejemplos de tales formulaciones se divulgan en, p. ej., WO 2017/138877, WO 2017/138878, WO 2019/032026 y WO 2019/032027.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de DPP-IV, incluyendo gliptinas tales como sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina, gemigliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, omarigliptina, evogliptina, gosogliptina y dutogliptina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la HMG CoA reductasa, como fluvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina, mevastatina, rosuvastatina, bervastatina o dalvastatina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la absorción del colesterol, como la ezetimiba, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista PPAR alfa, incluidos fibratos como clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, ronifibrato y simfibrato, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista PPAR gamma, incluidas las tiazolidinedionas, como pioglitazona, rosiglitazona y lobeglitazona, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista dual PPAR alfa/gamma, incluidos gliptazares como saroglitazar, aleglitazar, muraglitazar o tesaglitazar, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista dual PPAR alfa/delta, como el elafibranor.

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista PPAR pan (es decir, un agonista PPAR que tiene actividad en todos los subtipos: α, γ y

δ), como IVA337.

- 5 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con moduladores del receptor X farnesoide (FXR), incluidos agonistas de FXR como cafestol, ácido quenodesoxicólico, ácido 6 $\alpha$ -etil-quenodesoxicólico (ácido obeticólico; INT-747), fexaramina, tropifexor, cilofexor y MET409.
- 10 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un modulador del receptor TGR5, incluyendo agonistas TGR5 como el ácido 6 $\alpha$ -etil-777(S)-metilcólico (INT-777).
- 15 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista dual FXR/TGR5 como INT-767.
- 20 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con ácido ursodesoxicólico (UDCA). En otra realización, los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en combinación con ácido nor-ursodesoxicólico (nor-UDCA).
- 25 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un modulador de FGF19, como NGM282.
- 30 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista de FGF21, como BMS-986036.
- 35 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la integrina, como PLN-1474 y PLN-1474.
- 40 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de CCR2/CCR5, como cenicriviroc.
- 45 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la proteasa caspasa, como emricasan.
- 50 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la esteroil-CoA desaturasa (SCD), como el aramchol (ácido araquidil amido colanoico).
- 55 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), como selonsertib.
- 60 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de LOXL2, como simtuzumab.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de ACC, tal como GS-0976.
- 65 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista del receptor- $\beta$  de la hormona tiroidea, como MGL3196.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista del GLP-1 como la liraglutida.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un péptido similar al glucagón dual y agonistas del receptor de glucagón, como SAR425899.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor del transportador mitocondrial de piruvato, como MSDC-0602K.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agente antioxidante, como la vitamina E.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de SGLT1, un inhibidor de SGLT2 o un inhibidor dual de SGLT1 y SGLT2. Ejemplos de

## ES 3 002 777 T3

tales compuestos son dapagliflozina, sotagliflozina, canagliflozina, empagliflozina, LIK066 y SGL5213.

- 5 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la diacilglicerol O-aciltransferasa 06865571 (DGAT2), como DGAT2RX y PF-06865571.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la sintasa de ácidos grasos (FASN), como TVB-2640.
- 10 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un activador de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), como PXL-770.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista del receptor de glucocorticoides (GR), un antagonista del receptor de mineralocorticoides (MR), o un antagonista dual GR/MR. Ejemplos de tales compuestos son MT-3995 y CORT-118335.
- 15 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista del receptor cannabinoide 1 (CB1), como IM102.
- 20 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un activador de Klothoβ (KLB) y del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), tal como MK-313 (anteriormente conocido como NGM-313).
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor del ligando de quimioquinas (motivo c-c) 101 (CCL24), como CM101.
- 25 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista A3, como PBF-1650.
- 30 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista del receptor P2x7, tal como SGM 1019.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con agonistas del receptor P2Y13, como CER-209.
- 35 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un oxisterol sulfatado, como Dur-928.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista de los receptores de leucotrieno D4 (LTD4), como MN-001.
- 40 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de células T asesinas naturales de tipo 0621 (NKT1), como GRI-0621.
- 45 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un compuesto anti-lipopolisacárido (LPS), como IMM-124E.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de VAP1, como BI1467335.
- 50 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista del receptor de adenosina A3, tal como CF-102.
- En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un activador de SIRT-20, como NS-20.
- 55 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un agonista del receptor 1 del ácido nicotínico, como ARI-3037MO.
- 60 En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista de TLR4, como JKB-121.
- En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la cetohexoquinasa, como PF-06835919.
- 65 En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran

en combinación con un agonista del receptor de adiponectina, como ADP-335.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de autotaxina, como PAT-505 y PF8380.

5

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un antagonista del receptor 3 de quimioquinas (motivo c-c) (CCR3), como bertilimumab.

10

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un estimulador del canal de cloruro, como cobiprostona y lubiprostona.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la proteína de choque térmico 47 (HSP47), como ND-L02-s0201.

15

En otra realización, los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor del factor de transcripción de la proteína de unión a elementos reguladores del esteroide (SREBP), como CAT-2003 y MDV-4463.

20

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con una biguanidina, como la metformina.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con insulina.

25

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la glucógeno fosforilasa y/o un inhibidor de la glucosa-6-fosfatasa.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con una sulfonilurea, como glipizid, glibenklamid y glimepirid.

30

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con una meglitinida, como repaglinida, nateglinida y ormgilitinida.

35

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la glucosidasa, como acarbosa o miglitol.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de la escualeno sintasa, como TAK-475.

40

En otra realización, los compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran en combinación con un inhibidor de PTPB1, como trodusquemina, eriprotafib, JTT-551 y claramina.

#### *Preparación de compuestos*

45

Los compuestos de la invención pueden prepararse como un ácido libre o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mediante los procesos descritos a continuación. A lo largo de la siguiente descripción de dichos procesos se entiende que, cuando sea apropiado, se añadirán grupos protectores adecuados a los diversos reactivos e intermedios, y posteriormente se eliminarán de los mismos, de un modo que será fácilmente comprendido por un experto en el arte de la síntesis orgánica. Los procedimientos convencionales para utilizar tales grupos protectores así como ejemplos de grupos protectores convenientes se describen por ejemplo en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis por P.G.M Wutz y T.W. Greene, 4ª edición, John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.

50

#### *Métodos generales*

55

Todos los disolventes utilizados eran de grado analítico. Para las reacciones se utilizaron de forma rutinaria disolventes anhidros disponibles en el mercado. Los materiales de partida procedían de fuentes comerciales o se prepararon según los procedimientos de la bibliografía. El 1,1-dióxido de 3,3-dibutil-8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y el 1,1-dióxido de 8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina pueden prepararse como se describe en el documento WO 02/50051 (métodos 26 y 117, respectivamente). La 7-bromo-3,3-dietil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona y el 1,1-dióxido de 3,3-dietil-8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina pueden prepararse como se describe en el documento WO 2019/234077 (Intermedios 56 y 60, respectivamente). La temperatura ambiente se refiere a 20 - 25 °C. Las composiciones de las mezclas de disolventes se indican como porcentajes o relaciones de volumen.

60

65

#### **LCMS:**

**Nombre del instrumento:** Agilent 1290 infinity II.

## ES 3 002 777 T3

- Método A:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en H<sub>2</sub>O: ACN (95:5), B: ACN; caudal: 1,5 mL/min; columna: ZORBAX XDB C-18 (50 x 4.6 mm) 3.5 µm.
- Método B:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en agua, B: ACN; caudal: 1,2 mL/min; columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm), 3.5 µm.
- 5 **Método C:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en agua: ACN (95:5), B: ACN; caudal: 1,5 mL/min; columna: ATLANTIS dC18 (50 x 4.6 mm), 5 µm.
- Método D:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc en agua, B: ACN; caudal: 1,2 mL/min; columna: Zorbax Extend C18 (50 x 4.6mm) 5 µm.
- 10 **Método E:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua: ACN (95:5), B: 0,1% TFA en ACN; caudal: 1,5 mL/min; Columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm), 3.5 µm.
- Método F:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: 0,1% TFA en ACN; caudal: 0,8 mL/min; columna: ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (50 x 2.1 mm), 1.8 µm.
- Método G:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: 0,1% TFA en ACN; caudal: 0,8 mL/min; columna: Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm), 1.7 µm.
- 15 **Método H:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, B: 100% ACN; caudal: 0,8 mL/min; Columna: Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50) mm; 1.7 µm.
- Método I:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en agua: ACN (95:5), B: ACN, Caudal: 0,8 mL/min; Columna: ZORBAX ECLIPSE PLUS C18 (2.1 x 50) mm, 1.8 µm.
- 20 **Método J:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: ACN; Caudal: 1,0 mL/min; Columna: Zorbax Extend C18 (50 x 4.6 mm), 5 µm.
- Método K:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: 0,1% TFA en ACN; caudal: 1,5 mL/min; Columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm), 3.5 µm.
- Método L:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: 100% ACN; caudal: 1,5 mL/min; Columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm), 3.5 µm.
- 25 **UPLC:**  
**Nombre del instrumento:** waters Acquity I Class  
**Método A:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en agua, B: 0,1% HCOOH en ACN; Caudal: 0,8 mL/min  
Columna: Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 50) mm; 1.8 µm.
- 30 **Nombre del instrumento:** Shimadzu Nexera X2 LC / 2020 MSD  
**Método B:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en agua, B: ACN, Caudal: 0,8 mL/min; Columna: Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50) mm; 1.7 µm.
- 35 **HPLC:**  
**Nombre del instrumento:** Instrumentos de la serie Agilent 1260 Infinity II según el seguimiento mediante % con detección UV (maxplot).  
**Método A:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en agua, B: ACN; caudal: 1,0 mL/min; columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm, 3.5 µm).
- 40 **Método B:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: 0,1% TFA en ACN; caudal: 2,0 mL/min; columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm, 3.5 µm).
- Método C:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc en agua mili-q, B: ACN; caudal: 1,0 ml/min; columna: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 3.0 µm).
- 45 **Método D:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: ACN; caudal: 1,0 mL/min; columna: ATLANTIS dC18 (250 x 4.6 mm, 5.0 µm).
- Método E:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua, B: ACN, caudal: 2,0 mL/ min; columna: X-Bridge C8 (50 X 4.6 mm, 3.5 µm).
- SFC Quiral:**  
**Nombre del instrumento:** PIC SFC 10 (analítico)  
La proporción entre CO<sub>2</sub> y co-disolvente oscila entre 60:40 y 80:20
- 50 **Método A:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: YMC Amylose-SA (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método B:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak AD-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- 55 **Método C:** Fase móvil: 20 mM de amoníaco en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: YMC Cellulose-SC (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método D:** Fase móvil: metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método E:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 5 mL/min; columna: Lux C4.
- Método F:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: YMC Cellulose-SC.
- Método G:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1.
- 60 **Método H:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método I:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Chiral CCS (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método J:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 5 mL/min; columna: YMC Cellulose-SC AD-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- 65 **Método K:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en metanol; caudal: 4 mL/min; columna: (R,R)- Whelk-01 (250 x 4.6 mm, 5 µm).
- Método L:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Chiralcel OX-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método M:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en IPA; caudal: 5 mL/min; columna: YMC Cellulose- SC (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método N:** Fase móvil: metanol, caudal: 5 mL/min; columna: Chiralcel OX-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

5 **Método O:** Fase móvil: 0,1% Isopropilamina en IPA:metanol (1:1), caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak AS-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método P:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en metanol, caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak AS-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método Q:** Fase móvil: IPA, caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 4.6 mm, 5 µm).

10 **Método R:** Fase móvil: 0,1% Isopropilamina en IPA:metanol (1:1), caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método S:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en metanol, caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak OX-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**Método T:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en IPA, caudal: 4 mL/min; columna: YMC Cellulose- SB (250 x 4.6 mm, 5 µm).

15 **Método U:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en IPA, caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak AS-H (250 x 4.6 mm, 5 µm).

**HPLC Prep.:**

**Nombre del instrumento:** Agilent 1290 Infinity II

20 **Método A:** Fase móvil: A: 0,1% TFA en agua; Fase móvil; B: 0,1% TFA en CAN; caudal: 2,0 mL/min; Columna: X-Bridge C8 (50 X 4.6 mm, 3.5 µm).

**Método B:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc en agua; B: ACN; caudal: 35 mL/min; columna: X select C18 (30 x 150 mm, 5 µm).

**Método C:** Fase móvil: A: 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en agua, B: ACN; caudal: 1,0 mL/min; columna: XBridge C8 (50 x 4.6 mm, 3.5 µm).

25 **Método D:** Fase móvil: A: 0,1% HCOOH en agua; B: ACN; caudal: 1,0 mL/min; columna: X-select C18 (30 x 150 mm, 5 µm).

**SFC Preparativa Quiral:**

**Nombre del instrumento:** PIC SFC 100 y PSC SFC 400

30 La proporción entre CO<sub>2</sub> y co-disolvente oscila entre 60:40 y 80:20

**Método A:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: YMC Amylose-SA (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método B:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Chiralpak AD-H (250 x 30 mm, 5 µm).

35 **Método C:** Fase móvil: 20 mM de amoníaco en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: YMC Cellulose-SC (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método D:** Fase móvil: metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Chiral CCS (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método E:** Fase móvil: metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método F:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método G:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 3 mL/min; columna: Chiral CCS (250 x 30 mm, 5 µm).

40 **Método H:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en IPA, caudal: 5 mL/min; columna: YMC Amylose-SC (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método J:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en IPA; caudal: 3 mL/min; columna: Chiralcel OX-H (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método K:** Fase móvil: 0,5% de isopropilamina en metanol; caudal: 5 mL/min; columna: YMC Cellulose-SC (250 x 30 mm, 5 µm).

**Método L:** Fase móvil: metanol; caudal: 5 mL/min; columna: Chiralcel OX-H (250 x 30 mm, 5 µm).

45 **Método M:** Fase móvil: 0,5% Isopropilamina en metanol, caudal: 3 mL/min; columna: Lux A1 (250 x 30 mm, 5 µm).

*Abreviaturas:*

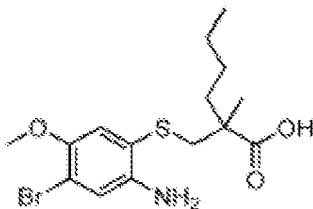
50	ACN	Acetonitrile :
	DCM	diclorometano
	DBAD	azodicarboxilato de di-terc-butilo
	DMF	Dimetilformamida
	0,1% IPA	alcohol isopropílico
	LCMS	Cromatografía Líquida Espectrometría de Masas
55	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
	PE	éter de petróleo
	SFC	cromatografía de fluidos supercríticos
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
60	TLC	cromatografía en capa fina
	UPLC	cromatografía líquida de ultra alta resolución

La invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos que no limitan la invención en ningún aspecto.

65 EJEMPLOS

## Intermedio 1

## Ácido 2-(((2-amino-4-bromo-5-metoxifenil)tio)metil)-2-metilhexanoico



5

10

15

20

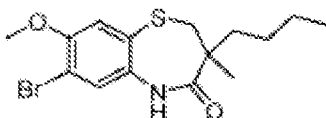
A una solución agitada de 5-bromo-6-metoxibenzo[d]tiazol-2-amina (63 g, 0,243 mol) en agua (630 mL), se añadió KOH (218,2 g, 3,89 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 120 °C. Una vez completada la reacción (monitorizada por LCMS), la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota una solución de ácido 2-(bromometil)-2-metilhexanoico (70,5 g, 6,31 mol) en THF (210 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (monitorizada por LCMS), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se acidificó con HCl conc. (pH ~2). La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (2 x 350 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con agua (150 mL) y salmuera (150 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El crudo resultante se envió como tal al siguiente paso sin ninguna purificación adicional. **Rendimiento:** 75 g (crudo, goma marrón).

25

**LCMS** (Método A) 376,1(M<sup>+</sup>), 378,0 (M<sup>+2</sup>), Rt. 2,44 min, 92,97% (Máx).

## Intermedio 2

## 7-Bromo-3-butil-8-metoxi-3-metil-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona



30

35

A una solución agitada de ácido 2-((2-amino-4-bromo-5-metoxifenil)tio)metil)-2-metilhexanoico (Intermedio 1; 75,0 g, 0,199 mol) en EtOAc (750 mL) a 0 °C, se añadieron gota a gota trietilamina (60,4 g, 0,59 mol) y solución de anhídrido 1-propanofosfónico (50% en EtOAc, 95,1 g, 0,29 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (monitorizada por UPLC), la mezcla de reacción se extinguió con agua (150 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 200 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (150 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se concentró al vacío y el material bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10-12% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 63% (45 g, sólido blanquecino).

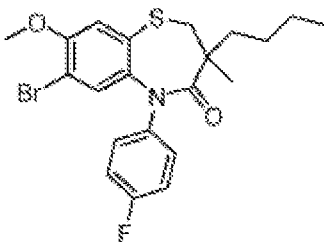
40

45

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.62 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.17 (s, 2H), 1.46- 1.44 (m, 2H), 1.22 (s, 3H), 1.17-1.14 (m, 4H), 0.79 (t, J = 6.8 Hz, 3H). **LCMS** (Método A) 360.0 (M<sup>+2</sup>), Rt. 2,64 min, 97,14% (Máx).

## Intermedio 3

## 7-Bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona



55

60

A una solución de 7-bromo-3-butyl-8-metoxi-3-metil-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 2; 5 g, 14 mmol) en I-bromo-4-fluorobenceno (50 mL), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seco (3.9 g, 28 mmol), CuI (0,26 g, 1,4 mmol) y tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (0,9 g, 2,8 mmol) y la mezcla de reacción se calentó durante 16 horas a 135 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo obtenido se particionó entre agua (25 mL) y EtOAc (25 mL). La parte acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua

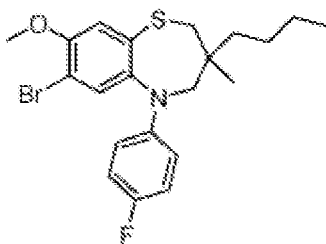
65

helada (100 mL) y salmuera (100 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo obtenido se trituró con éter de petróleo. El sólido obtenido se filtró y se secó para obtener el compuesto base. Rendimiento: 85% (5,5 g, sólido marrón pálido).

5 **LCMS** (Método E) 451.9 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,26 min, 81,86% (Máx).

#### Intermedio 4

#### 7-bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina

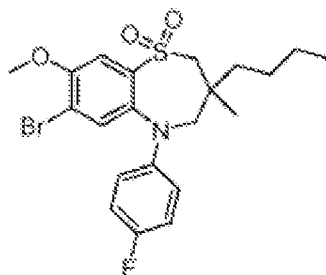


10  
15  
20  
25  
A una solución de 7-bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 3; 5,2 g, 11,5 mmol) en THF (50 mL) a 0 °C, se añadió dimetilsulfuro de borano (IM en THF, 58 mL, 58 mmol) y la mezcla de reacción se calentó durante 16 horas a 75 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se añadió metanol (60 mL) y la mezcla de reacción se calentó durante 2 horas a 60 °C. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró al vacío y el residuo obtenido se repartió entre agua (50 mL) y EtOAc (50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua helada (100 mL) y salmuera (100 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 5,3 g (goma cruda, incolora).

30 **LCMS** (Método E) 439.9 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,55 min, 87,61% (Máx).

#### Intermedio 5

#### 1,1-dióxido de 7-bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina



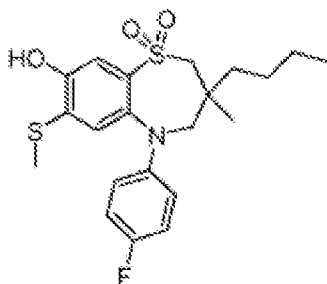
35  
40  
45  
50  
A una solución de 7-bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 4; 5,3 g, 12,1 mmol) en una mezcla de THF y agua (8:2, 55 mL), se añadió oxona (37,16 g, 120,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con agua helada (100 mL) y salmuera (100 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 15% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 75% (4,3 g, sólido blanco).

55 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.45 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.12-7.05 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.85-3.61 (m, 2H), 3.29 (s, 2H), 1.52-1.39 (m, 1H), 1.37-1.26 (m, 1H), 1.25-1.03 (m, 4H), 0.98 (s, 3H), 0.81-0.74 (m, 3H). **LCMS** (Método E) 470.1 (M<sup>+</sup>), Rt. 3,21 min, 98,04% (Máx).

#### Intermedio 6

#### 1,1-dióxido de 3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3-metil-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetra hidro-1, 5- benzotiazepina

65

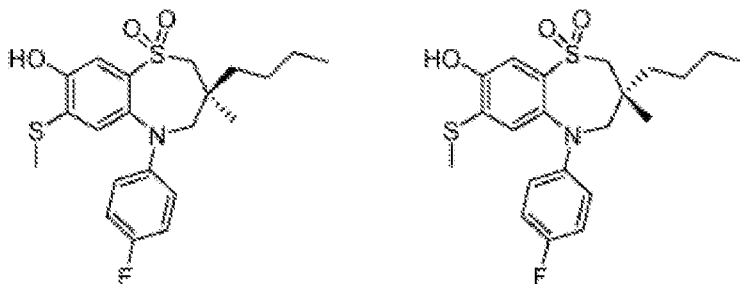


A una solución de 1,1-dióxido de 7-bromo-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 5; 4,3 g, 9,14 mmol) en DMF (43 mL), se añadió tiometóxido sódico (3,2 g, 45,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 80 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se extinguió con agua helada (25 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua helada (50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se concentró al vacío y el material bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 90% (3,5 g, sólido blanquecino).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.57 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.04-6.98 (m, 2H), 6.92-6.88 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 3.81-3.65 (m, 2H), 3.34-3.20 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.55-1.39 (m, 1H), 1.38-1.05 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.81-0.77 (m, 3H). **LCMS** (Método E) 424.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,78 min, 98,08% (Máx).

#### Separación de enantiómeros:

1,1-Dióxido de (S)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3-metil-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina y 1,1-dióxido de (R)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3-metil-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina



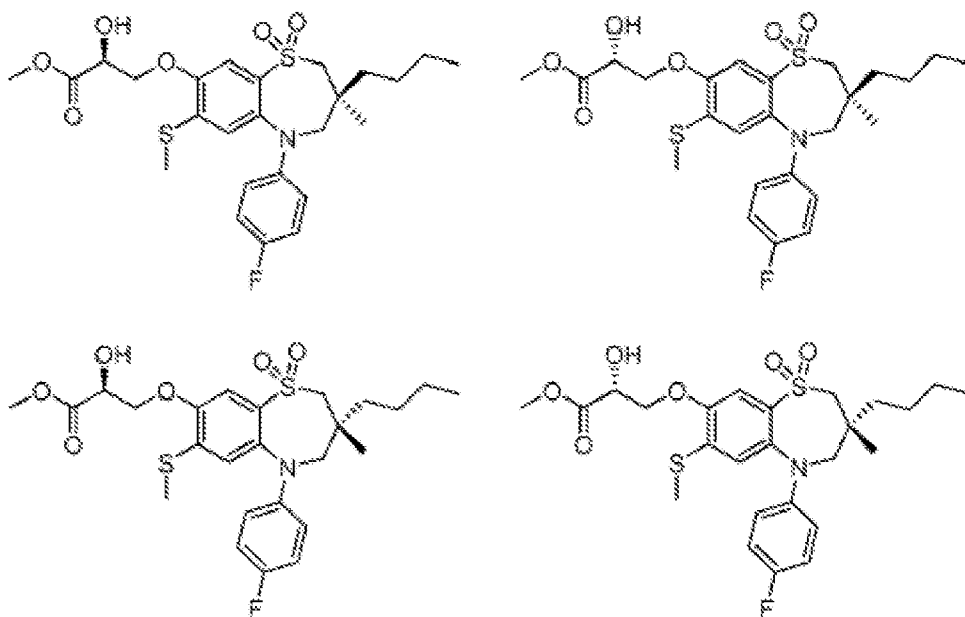
Los dos enantiómeros del 1,1-dióxido de 3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3-metil-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina racémico (2,8 g, 6,61 mmol) se separaron por SFC quiral (Método M). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al enantiómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al enantiómero 2. Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

Enantiómero 1: **Rendimiento:** 42% (1,2 g, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.56 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.04-6.98 (m, 2H), 6.92-6.88 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 3.80-3.50 (m, 2H), 3.20-3.15 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.58-1.36 (m, 1H), 1.35-1.03 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (t, J = 9.20 Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 424.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,79 min, 93,0% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,56 min, 93,77% (Máx). **SFC Quiral:** (Método M) Rt. 1,70 min, 99,78% (Máx).

Enantiómero 2: **Rendimiento:** 44% (1,25 g, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.57 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.03-6.99 (m, 2H), 6.92-6.91 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 4.00-3.40 (m, 2H), 3.24-3.16 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.62-1.38 (m, 1H), 1.38-1.10 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (t, J = 8.40 Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 424.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,79 min, 98,86% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,56 min, 97,15% (Máx). **SFC Quiral:** (Método M) Rt. 2,51 min, 99,72% (Máx).

#### Intermedio 7

3-((3-Butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxi-propanoato de metilo (diastereómeros individuales)



#### Diastereómeros 1 y 2

A una solución agitada del enantiómero 1 del 1,1-dióxido de 3-butil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3-metil-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 6; 400 mg, 0.94 mmol) en DMF (4 mL), se añadieron porciones de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (615 mg, 1.83 mol) y metil-oxirano-2-carboxilato (867 mg, 8.49 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La mezcla de reacción se apagó con HCl diluido (1,5 N, 5 mL) y se diluyó con agua (5 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). La parte orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 35% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 50% (250 mg, goma blanca).

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.34 (s, 1H), 7.07-6.99 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 5.90 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.48 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.69 (s, 5H), 3.40-3.20 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.52-1.38 (m, 1H), 1.38-1.02 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.79 (t,  $J = 7.20$  Hz, 3H). **LCMS:** (Método E) 526.0 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,95 min, 97,92% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,50 min, 96,34% (Máx).

Los dos diastereómeros (210 mg, 0,39 mmol) se separaron por SFC quiral (método G). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al diastereómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al diastereómero 2.

#### Diastereómeros 3 y 4

Se obtuvo una mezcla de diastereómeros 3 y 4 del compuesto base siguiendo el mismo procedimiento, partiendo de 400 mg del enantiómero 2 del intermedio 6. **Rendimiento:** 50% (250 mg, goma amarilla).

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.34 (s, 1H), 7.08-6.99 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 5.89 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 4.49-4.47 (m, 1H), 4.27-4.26 (m, 2H), 3.69-3.67 (m, 5H), 3.23-3.20 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.55-1.40 (m, 1H), 1.40-1.05 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.79 (t,  $J = 9.60$  Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 526.0 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,95 min, 97,93% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,50 min, 96,46% (Máx).

Los dos diastereómeros (210 mg, 0,39 mmol) se separaron por SFC quiral (método G). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al diastereómero 3 y la segunda fracción de elución correspondió al diastereómero 4.

Diastereómero 1: **Rendimiento:** 38% (80 mg, sólido amarillo claro).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.34 (s, 1H), 7.08-6.99 (m, 4H), 6.71 (s, 1H), 5.89 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.48 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.27 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 3.69 (s, 5H), 3.31-3.22 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.52-1.38 (m, 1H), 1.30-1.10 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.79 (t,  $J = 9.20$  Hz, 3H). **LCMS** (Método G) 526,2 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,32 min, 99,80% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,58 min, 99,40% (Máx). **SFC Quiral:** (Método G) Rt. 2,68 min, 99,38% (Máx).

Diastereómero 2: **Rendimiento:** 38% (80 mg, sólido amarillo claro).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.34 (s, 1H), 7.08-

6.96 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 5.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.69 (s, 5H), 3.31-3.22 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.55-1.40 (m, 1H), 1.24-1.11 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.79 (t, J = 9.20 Hz, 3H). **LCMS** (Método G) 526,2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,32 min, 98,65% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,50 min, 99,46% (Máx). **SFC Quiral**: (Método G) Rt. 4,02 min, 99,75% (Máx).

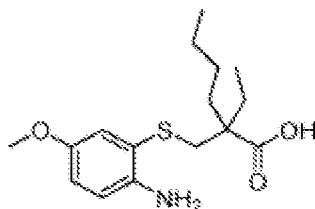
Diastereómero 3: **Rendimiento**: 40% (85 mg, sólido amarillo claro). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.35 (s, 1H), 7.08-6.99 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 5.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.49-4.48 (m, 1H), 4.28-4.26 (m, 2H), 3.75-3.50 (m, 5H), 3.23-3.17 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.55-1.35 (m, 1H), 1.32-1.06 (m, 5H), 1.00 (s, 3H), 0.90-0.70 (m, 3H). **LCMS** (Método E) 526.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,98 min, 97,37% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,58 min, 96,35% (Máx). **SFC Quiral**: (Método G) Rt. 2,36 min, 99,90% (Máx).

Diastereómero 4: **Rendimiento**: 38% (80 mg, sólido amarillo claro). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.35 (s, 1H), 7.07-6.99 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 5.89 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.50-4.47 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 2H), 3.95-3.45 (m, 5H), 3.27-3.23 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.27-1.08 (m, 6H), 0.99 (s, 3H), 0.79 (t, J = 7.20 Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 526.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,96 min, 97,20% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,51 min, 99,09% (Máx). **SFC Quiral**: (Método G) Rt. 3,31 min, 99,48% (Máx).

Se desconoce la configuración absoluta de los cuatro diastereómeros.

### Intermedio 8

#### Ácido 2-(((2-amino-5-metoxifenil)tio)metil)-2-etilhexanoico

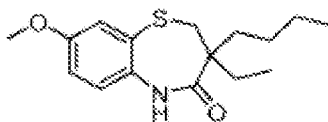


A una solución agitada de 6-metoxibenzo[d]tiazol-2-amina (270 g, 1,498 mol) en agua (2700 mL), se añadió KOH (1345 g, 23,96 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 120 °C. Una vez completada la reacción (monitorizada por LCMS), la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota una solución de ácido 2-(bromometil)-2-etilhexanoico (533 g, 2,25 mol) en THF (1000 mL) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (monitorizada por LCMS), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se acidificó con HCl concentrado (pH ~2). La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (2 x 4000 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con agua (1000 mL) y salmuera (1000 mL). A continuación, la parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío para obtener el material bruto, que pasó como tal a la etapa siguiente sin más purificación. **Rendimiento**: 590 g (crudo, goma marrón).

**LCMS** (Método A) 312.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,24 min, 97,34% (Máx).

### Intermedio 9

#### 3-Butil-3-etil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona



A una solución agitada de ácido 2-(((2-amino-5-metoxifenil)tio)metil)-2-etilhexanoico (Intermedio 8; 590 g, 1,89 mol) en EtOAc (2500 mL) a 0 °C, se añadieron gota a gota trietilamina (530 mL, 3,78 mol) y solución de anhídrido 1-propanofosfónico (50% en EtOAc; 785 g, 2,46 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (monitorizada por LCMS), se añadió agua (2000 mL) a la mezcla de reacción y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 2000 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (800 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante lavado con metanol para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 48% (265 g, sólido blanquecino).

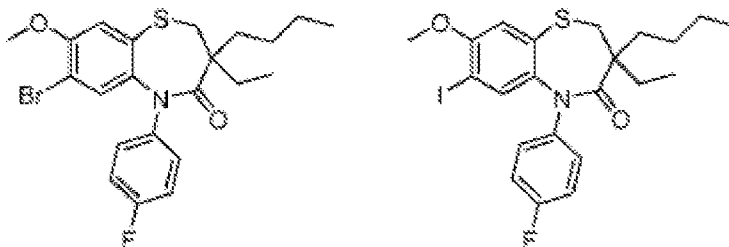
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.53 (s, 1H), 7.04-7.01 (m, 2H), 6.87-6.86 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.50 (s, 2H), 1.68-1.66 (m, 4H), 1.50-1.48 (m, 4H), 0.79-0.72 (m, 6H). **LCMS** (Método A) 294.3 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,68 min, 99,47% (Máx).

### Intermedio 10

**7-Bromo-3-butil-3-etil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona**

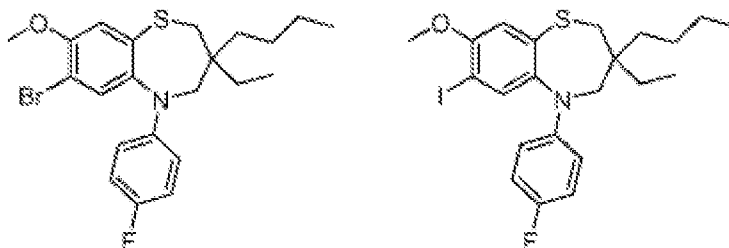
A una solución agitada de 3-butil-3-etil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 9; 265 g, 0,903 mol) en una mezcla 1:1 de DCM y acetonitrilo (2650 mL), se añadió porciones de N-bromo succinimida (209 g, 1,17 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), se concentró la mezcla de reacción. El material crudo obtenido se trató con acetonitrilo frío y se agitó durante 30 minutos. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con acetonitrilo frío (2 x 100 mL) y se secó al vacío para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 179 g (79%, crudo, sólido marrón).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.61 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.98 (s, 2H), 1.70- 1.68 (m, 4H), 1.48-1.45 (m, 4H), 0.84-0.82 (m, 6H). **LCMS** (Método A) 372.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,83 min, 99,20% (Máx).

**Intermedio 11****7-Bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona y 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona**

A una solución agitada de 7-bromo-3-butil-3-etil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ono (Intermedio 10; 15 g, 40,2 mmol) en I-fluoro-4-yodobenceno (50 mL), se añadieron yoduro de cobre (I) (1,58 g, 0,8 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11 g, 80,5 mmol) y la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 20 minutos para desgasificar. A continuación se añadió tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (1,3 mL, 4,0 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción resultante se calentó durante 16 horas a 135 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se filtró a través de celita y la almohadilla de celita se lavó con EtOAc (200 mL). El filtrado se lavó con agua (100 mL) y salmuera (75 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 5% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 64% (12,2 g, sólido blanquecino).

**LCMS** (Método E) 467,1 (M<sup>+</sup>+2 para el compuesto sustituido por 7-bromo y 514,1 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo), Rt. 3,33 min, 92,83% (Máx).

**Intermedio 12****7-bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina**

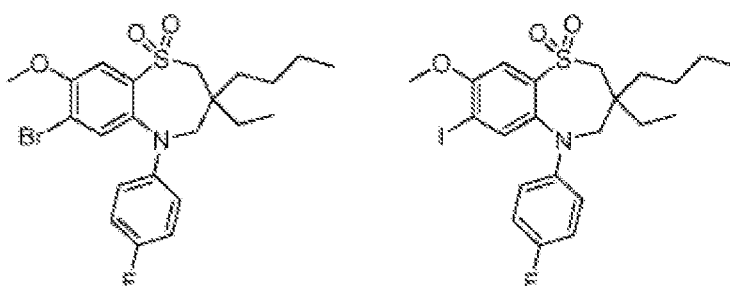
A una solución agitada de una mezcla de 7-bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona y 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 11; 12 g, 25,7 mmol) en THF (100 mL) a 0 °C se añadió gota a gota dimetilsulfuro de borano (2M en THF; 38 mL, 77 mmol) y la

mezcla de reacción se sometió a reflujo. 7 mmol) en THF (100 mL) a 0 °C se añadió gota a gota dimetilsulfuro de borano (2M en THF; 38 mL, 77 mmol) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 16 horas a 65 °C. Una vez completada la reacción (monitorizada por TLC), la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, se extinguió con metanol (20 mL) y se calentó durante 2 horas a 65 °C. La mezcla de reacción resultante se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua (100 mL) y la capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 100 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se concentró al vacío y el crudo resultante se envió como tal al paso siguiente sin más purificación. **Rendimiento:** 10 g (crudo, goma negra).

LCMS (Método E) 451,8 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-bromo y 499,7 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo, Rt. 3,78 min, 75,13% (Máx).

#### Intermedio 13

1,1-Dióxido de 7-bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina

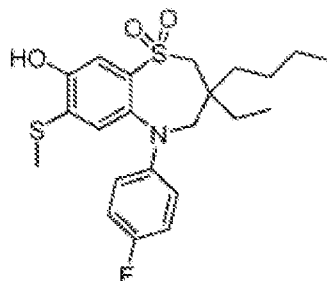


A una solución agitada de una mezcla de 7-bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2, 3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2, 3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 12; 10 g, 26.6 mmol) en THF (100 mL) y agua (60 mL), se añadió oxona (81 g, 26,6 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo Buchner y el filtrado se extrajo con EtOAc (2 x 200 mL), La capa orgánica combinada se lavó con agua (100 mL) y salmuera (100 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 15% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 54% (7 g, sólido blanco).

LCMS (Método E) 486,0 (M<sup>+</sup>+2) para el compuesto sustituido por 7-bromo y 532,0 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo, Rt. 2,87 min, 91,53% (Máx).

#### Intermedio 14

1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5- benzotiazepina

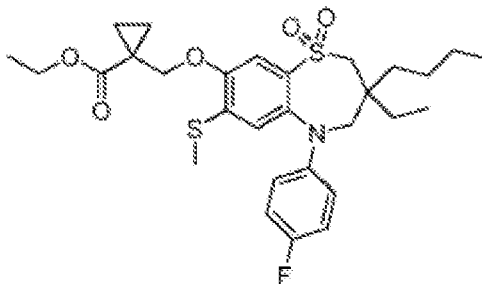


A una solución agitada de una mezcla de 1,1-dióxido de 7-bromo-3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2, 3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 13; 3 g, 6.2 mmol) en DMF (16 mL), se añadió tiometóxido sódico (2,1 g, 31 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 65 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó con agua (25 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 77% (2,13 g, sólido marrón).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.49 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.06-6.96 (m, 4H), 6.61 (s, 1H), 3.62 (bs, 2H), 3.21 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.61-1.25 (m, 4H), 1.20-1.01 (m, 4H), 0.81-0.74 (m, 6H). LCMS (Método A) 438.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,78 min, 87,79% (Máx).

5 Intermedio 15:

**1-((3-Butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxilato de etilo**



10

15

20

25

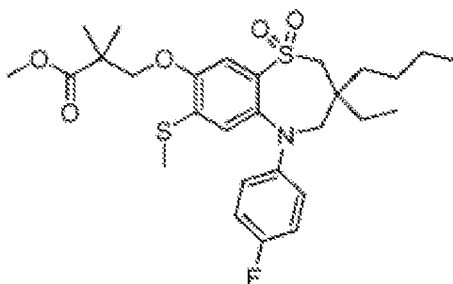
30

A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 14; 200 mg, 0,45 mmol) en DMF (5 mL) se añadieron trifetilfosfina (180 mg, 0,68 mmol) y ciclopropanocarboxilato de etilo (99 mg, 0,68 mmol) y DBAD (210 mg, 0,91 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua (10 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (15 mL) y salmuera (15 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 11% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 93% (240 mg, goma incolora).

LCMS (Método E) 564.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,33 min, 95,41% (Máx).

35 **Intermedio 16**

**3-((3-Butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoato de metilo**



40

45

50

55

A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 14; 0,5 g, 1,10 mmol) en THF (10 mL) a 0 °C se añadieron 3-hidroxi-2,2-dimetilpropanoato de metilo (0,15 g, 1,10 mmol) y trifetilfosfina (0,43 g, 1,60 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. A continuación se añadió DBAD (0,50 g, 2,20 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con agua (10 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 15 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2 x 15 mL) y salmuera (15 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 47% (0,30 g, sólido blanco).

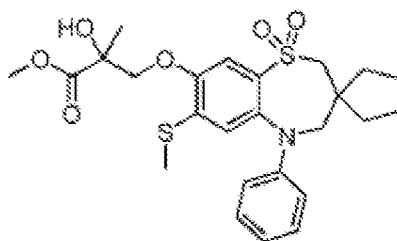
60

LCMS (Método E) 552.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,32 min, 85,43% (Máx).

**Intermedio 17**

**3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxi-2-metilpropanoato de metilo**

65



5

10

15

20

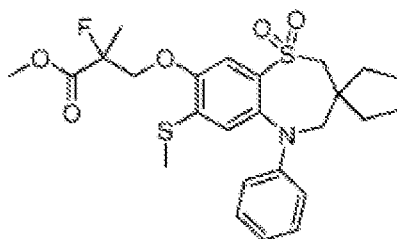
A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3,3-dietil-8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina (3,0 g, 9,4 mmol) en DMF (10 mL), se añadió  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (6,11 g, 18,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió metil-2-metilglidato (3,27 g, 28,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 72 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con HCl diluido (15 mL) y se diluyó con agua (10 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 15 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (15 mL) y salmuera (15 mL). La parte orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. Rendimiento: 29,35% (1,5g, sólido incoloro).

LCMS (Método E) 508.2 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,72 min, 99,88% (Máx).

#### Intermedio 18

25

#### 3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoato de metilo



30

35

A una solución agitada de 3-((3,3-di-etil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5- tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxi-2-metilpropanoato de metilo (Intermedio 17; 300 mg, 0,59 mmol) en DCM (10 mL) a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , se añadió trifluoruro de dietilaminosulfuro (0,09 g, 0,70 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con agua (5 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 43% (130 mg, sólido blanquecino).

40

45

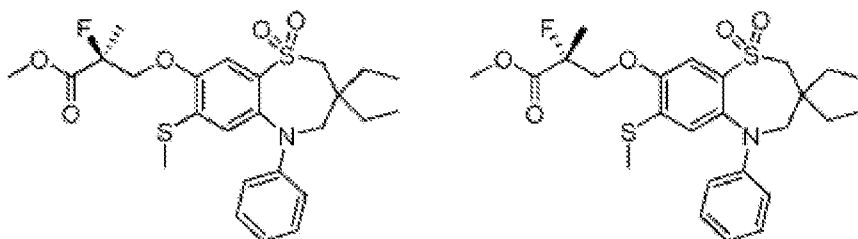
LCMS (Método E) 510.3 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,89 min, 98,90% (Máx).

#### Separación de enantiómeros:

50

(R)-3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoato de metilo y (S)-3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoato

55



60

65

Los dos enantiómeros del 3-((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoato de metilo racémico (100 mg, 0,19 mmol) se separaron por SFC quiral (método B). El material se

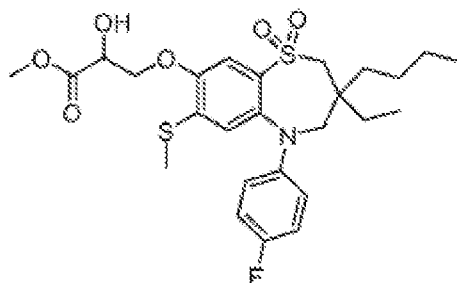
concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al enantiómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al enantiómero 2. Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

Enantiómero 1: **Rendimiento:** 30% (30 mg, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.36 (s, 1H), 7.22 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.86 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.50-4.39 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (bs, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.60-1.52 (m, 5H), 1.38-1.32 (m, 2H), 0.75 (t, J = 7.2 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 510.0 (M<sup>+</sup>H), Rt. 3,04 min, 96,42% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,90 min, 97,43% (Máx).

Enantiómero 1: **Rendimiento:** 30% (30 mg, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.35 (s, 1H), 7.22 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.86 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 4.50-4.42 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.60 (m, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.65-1.52 (m, 5H), 1.37-1.32 (m, 2H), 0.75 (t, J = 7.6 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 510.0 (M<sup>+</sup>H), Rt. 3,04 min, 98,16% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,90 min, 99,29% (Máx).

### Intermedio 19

#### 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo

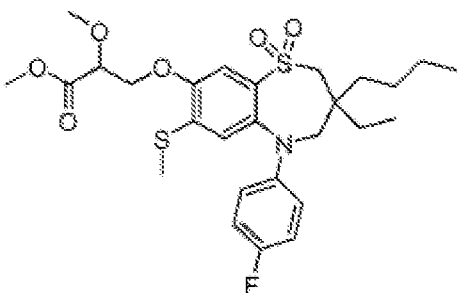


A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 14; 750 mg, 1,71 mmol) en DMF (6 mL), se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,11 g, 3,42 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota oxirano-2-carboxilato de metilo (0,42 mL, 5,14 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se extinguió con HCl diluido (1,5 N, 1 mL) y se diluyó con agua (1 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20-30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 50% (300 mg, goma incolora).

<sup>1</sup>H NMR: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.34 (s, 1H), 7.17-7.07 (m, 4H), 6.61 (s, 1H), 5.89 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.49-4.46 (m, 1H), 4.25 (t, J = 2.8 Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.62 (bs, 2H), 3.29 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.40-1.33 (m, 4H), 1.20-1.10 (m, 4H), 0.78-0.72 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 540.2 (M<sup>+</sup>H), Rt. 2,90 min, 94,13% (Máx).

### Intermedio 20

#### 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoato de metilo



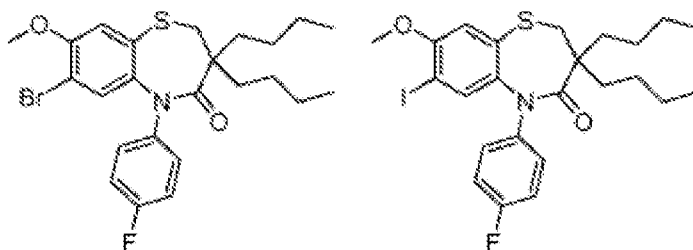
A una solución agitada de 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo (Intermedio 19; 100 mg, 0,18 mmol) en DMF (2 mL) a 0 °C, se añadió hidruro sódico (60%, 3,71 mg, 0,09 mmol) y la mezcla de reacción se agitó 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota una solución de yoduro de metilo (0,04 mL, 0,55 mmol) en DMF (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se extinguió con HCl diluido (1,5 N, 1 mL) y se diluyó con agua (1 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL).

La capa orgánica combinada se lavó con agua (10 mL) y salmuera (10 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20-30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 57% (60 mg, sólido blanco).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.32 (s, 1H), 7.07 (d, J = 6.80 Hz, 4H), 6.60 (s, 1H), 4.38-4.27 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.28 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.37-1.32 (m, 4H), 1.16-1.09 (m, 4H), 0.77-0.72 (m, 6H). LCMS (Método E) 554.3 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,01 min, 98,12% (Máx).

#### Intermedio 21

**7-bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona** y **3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona**

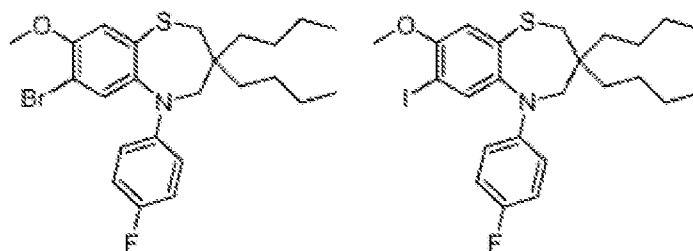


A una solución agitada de una mezcla de 7-bromo-3,3-dibutil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (3 g, 7,49 mmol) en 4-fluoriodobenceno (30 mL), se añadieron yoduro de cobre (I) (0,14 g, 0,74 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,07 g, 14,9 mmol) y la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 20 minutos para desgasificar. A continuación, se añadió tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (0,49 g, 1,49 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción resultante se calentó durante 16 horas a 135 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se filtró a través de celita y la almohadilla de celita se lavó con EtOAc (25 mL). El filtrado se lavó con agua (15 mL) y salmuera (15 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 95% (3,5 g, sólido amarillo pálido).

LCMS (Método E) 494,0 (M<sup>+</sup>) para el compuesto sustituido por 7-bromo y 541,9 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo, Rt. 3,50 min, 96,61% (Máx).

#### Intermedio 22

**7-Bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina** y **3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina**



A una solución agitada de una mezcla de 7-bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona y 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 21; 3,5 g, 7,07 mmol) en THF (35 mL) a 0 °C, se añadió gota a gota dimetilsulfuro de borano (2M en THF; 5,3 mL, 10,61 mmol) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 16 horas a 65 °C. Una vez completada la reacción (monitoreada por TLC), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se extinguió con metanol (10 mL) y se calentó durante 2 horas a 65 °C. La mezcla de reacción resultante se enfrió a temperatura ambiente, se concentró al vacío y el residuo se repartió entre agua (50 mL) y EtOAc (50 mL). La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 50 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con agua (25 mL) y salmuera (25 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío para obtener el crudo. El crudo resultante se envió como tal al siguiente paso sin ninguna purificación adicional. **Rendimiento:** 3,6 g (crudo, goma amarillo pálido).

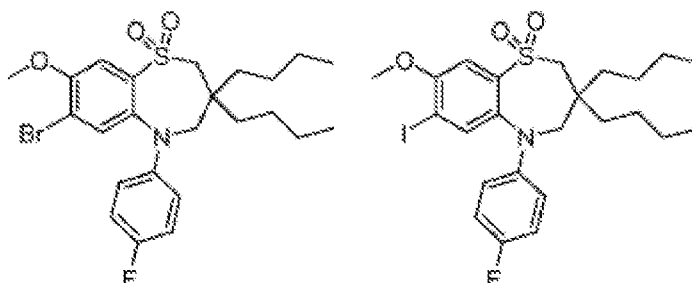
LCMS (Método E) 482,0 (M<sup>+</sup>+2H) para el compuesto sustituido por 7-bromo y 527,9 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo, Rt. 3,86 min, 81,04% (combinado para los compuestos sustituidos por bromo y yodo) (Máx).

## Intermedio 23

5 **1,1-dióxido de 7-bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 1,1-dióxido de 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina**

10

15



20

25

A una solución agitada de una mezcla de 7-bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 22; 3,6 g, 7,49 mmol) en ácido acético (36 mL), se añadieron tungstato sódico (360 mg, 0,01 mmol) y peróxido de hidrógeno (30% en H<sub>2</sub>O; 2,6 mL, 22,47 mmol) a 0 °C y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo Büchner y el filtrado se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (25 mL) y salmuera (25 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se concentró al vacío y el material bruto resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 12% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 79% (3,4 g, sólido blanquecino).

30

**LCMS:** ((Método A) 512,2 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-bromo y 560,2 (M<sup>+</sup>+H) para el compuesto sustituido por 7-yodo; Rt. 3,40 min, 70,63% (Máx).

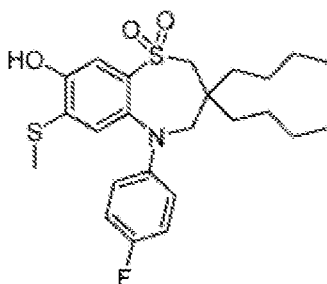
## Intermedio 24

35

**1,1-dióxido de 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina**

40

45



50

55

A una solución agitada de una mezcla de 1,1-dióxido de 7-bromo-3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina y 1,1-dióxido de 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-yodo-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 23; 1,6 g, 3,12 mmol) en DMF (16 mL), se añadió tiometoxido sódico (1,09 g, 15,6 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 65 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó con agua (15 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 25 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con salmuera (10 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 90% (1,3 g, sólido blanquecino).

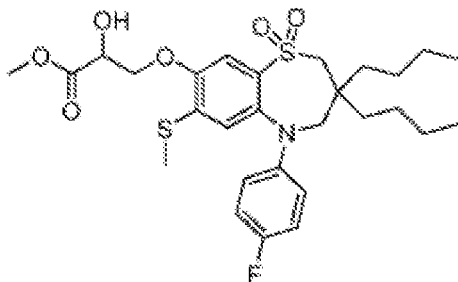
60

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.48 (s, 1H), 7.28 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.08-7.01 (m, 4H), 6.59 (s, 1H), 3.80-3.67 (m, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.36-1.33 (m, 4H), 1.12-1.03 (m, 8H), 0.79-0.77 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 466.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,23 min, 88,86% (Máx).

## Intermedio 25

65

**3-((3,3-Dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxipropanoato de metilo**



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

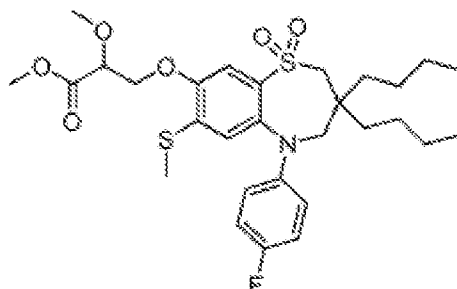
65

A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 24; 400 mg, 0,8602 mmol) en DMF (4 mL), se añadió  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (560 mg, 1,72 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota oxirano-2-carboxilato de metilo (0,2 mL, 2,58 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se extinguió con HCl diluido (1,5 N, 5 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20-30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 44% (215 mg, goma incolora).

**LCMS** (Método E) 568.1 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 3,18 min, 93,04% (Máx).

#### Intermedio 26

#### 3-((3,3-Dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoato de metilo

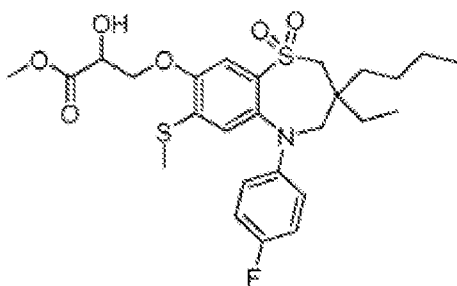


A una solución agitada de 3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo (Intermedio 25; 125 mg, 0,22 mmol) en DMF (2,5 mL) a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió hidruro de sodio (60%, 8,80 mg, 0,22 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. A continuación se añadió yoduro de metilo (0,08 mL, 1,32 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se extinguió con HCl diluido (1,5 N, 5 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (10 mL) y salmuera (10 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 20-30% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 38% (50 mg, sólido blanco).

**LCMS** (Método E) 582.2 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 3,29 min, 97,76% (Máx).

#### Intermedio 27

#### 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo



5

10

15

20

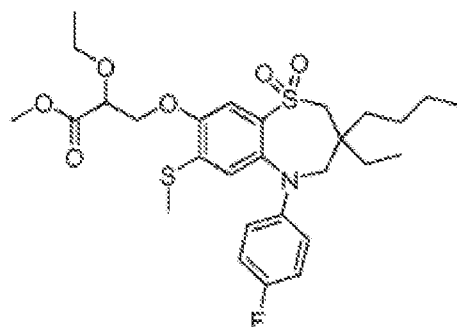
A una solución de 1,1-dióxido de 3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 14; 750 mg, 1.71 mmol) en DMF (10 mL), se añadieron  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,11 g, 3,42 mmol) y oxirano-2-carboxilato de metilo (0,52 g, 5,14 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con agua (10 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 15 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (15 mL) y salmuera (15 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 45% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 50% (300 mg, goma incolora).

LCMS (Método E) 540.2 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,90 min, 94,11% (Máx).

25

#### Intermedio 28

#### 3-((3-Butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoato de metilo



30

35

40

45

50

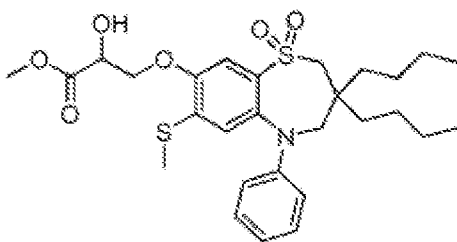
A una suspensión de NaH (60%, 21 mg, 0,55 mmol) en DMF seca (2 mL) a 0 °C, se añadió una solución de 3-(3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo (Intermedio 27; 300 mg, 0,55 mmol) en DMF (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos. A continuación se añadió yoduro de etilo (260 mg, 1,67 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con HCl diluido (1,5 N, 5 mL) a 0 °C, y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (15 mL) y salmuera (15 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 25% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 31% (98 mg, goma incolora).

LCMS (Método E) 568.3 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 3,09 min, 65,63% (Máx).

55

#### Intermedio 29

#### 3-((3,3-Dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo



60

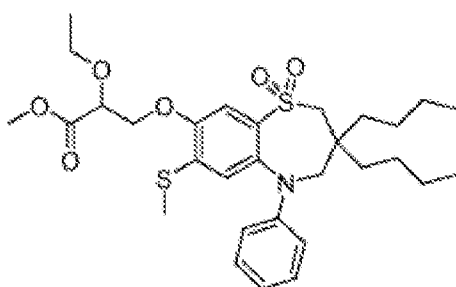
65

A una solución de 1,1-dióxido de 3,3-dibutil-8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (1,5 g, 3,35 mmol) en DMF (10 mL), se añadieron  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2,18 g, 6,70 mmol) y oxirano-2-carboxilato de metilo (1,02 g, 10,05 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a RT. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con agua (50 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 45% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 45% (600 mg, goma incolora).

LCMS (Método E) 550.1 ( $\text{M}^+\text{+H}$ ), Rt. 3,20 min, 98,81% (Máx).

### Intermedio 30

#### 3-((3,3-Dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoato de metilo

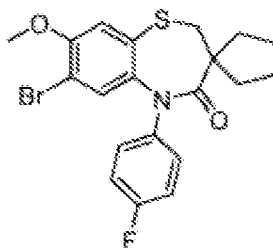


A una suspensión de NaH (60%, 35 mg, 0,55 mmol) en DMF seca (3 mL) a 0 °C, se añadió una solución de 3-((3,3-dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoato de metilo (Intermedio 29; 500 mg, 0,91 mmol) en DMF (7 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. A continuación se añadió yoduro de etilo (426 mg, 2,73 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con HCl diluido (1,5 N, 10 mL) a 0 °C y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 15 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (20 mL) y salmuera (20 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 25% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 30% (300 mg, goma incolora).

LCMS (Método E) 578.3 ( $\text{M}^+\text{+H}$ ), Rt. 3,28 min, 71,90% (Máx).

### Intermedio 31

#### 7-bromo-3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona

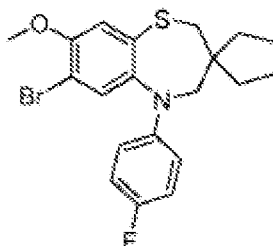


A una solución agitada de 7-bromo-3,3-dietil-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (20 g, 0,06 mol) en 4-bromo fluorobenceno (200 mL), se añadieron yoduro de cobre (I) (1,10 g, 0,006 mol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (16,05 g, 0,12 mol) y la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 20 minutos para desgasificar. A continuación se añadió Tris[2-(2-metoxietoxi)etil]amina (3,75 g, 0,01 mol) bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción resultante se calentó durante 3 días a 135 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC y UPLC), la mezcla de reacción se filtró a través de celita y la almohadilla de celita se lavó con EtOAc (100 mL). El filtrado se concentró al vacío y el residuo obtenido se repartió entre agua (100 mL) y EtOAc (50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (70 mL) y salmuera (70 mL). La parte orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 2-4% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 70% (18,0 g, sólido blanco).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.36 (s, 1H), 7.22-7.14 (m, 5H), 3.90 (s, 3H), 3.15 (s, 2H), 1.50-1.45 (m, 4H), 0.78 (t,  $J = 9.6$  Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 440,1 ( $\text{M}^+ + 2$ ), Rt. 2,97 min, 96,42% (Máx). **HPLC**: (Método E) Rt. 5,97 min, 94,16% (Máx).

### Intermedio 32

#### 7-bromo-3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina

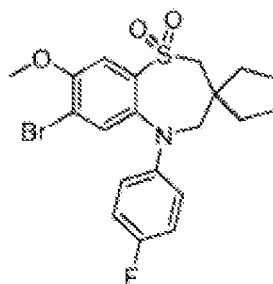


A una solución agitada de 7-bromo-3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona (Intermedio 31; 18,0 g, 0,04 mol) en THF (90 mL) a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió gota a gota dimetilsulfuro de borano (2M en THF, 102 mL, 0,21 mol) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 48 horas a  $70^\circ\text{C}$ . Una vez completada la reacción (monitorizada por UPLC), la mezcla de reacción se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se apagó con metanol (50 mL). La solución resultante se calentó durante 2 horas a  $70^\circ\text{C}$  y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo obtenido se particionó con agua (100 ml) y EtOAc (50 mL), y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (70 mL) y salmuera (70 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se concentró al vacío y el crudo resultante pasó a la etapa siguiente sin más purificación. **Rendimiento**: 21 g (crudo, sólido blanco).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.12-6.95 (m, 5H), 6.88 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.70-3.45 (m, 2H), 2.78 (s, 2H), 1.45-1.18 (m, 4H), 0.70 (t,  $J = 7.6$  Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 424,9 ( $\text{M}^+ + 2$ ), Rt. 3,44 min, 86,38% (Máx). **HPLC**: (Método E) Rt. 6,97 min, 94,07% (Máx).

### Intermedio 33

#### 1,1-dióxido 7-bromo-3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina

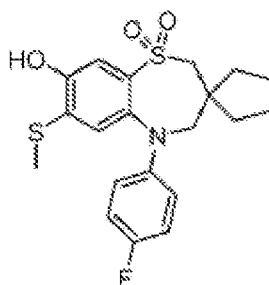


A una solución agitada de 7-bromo-3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 32; 21,0 g, 0,05 mol) en THF (147 mL), se añadió agua (63 mL), oxona (152,1 g, 0,49 mol) a  $0^\circ\text{C}$  y la mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), se filtró la mezcla de reacción. El filtrado se diluyó con agua (100 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (70 mL) y salmuera (70 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10% MeOH/DCM; gel de sílice: 230-400 mesh) y el producto obtenido se trituró con éter de petróleo (2 X 100 mL) para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 93% (21,0 g, sólido marrón).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.44 (s, 1H), 7.25-7.02 (m, 5H), 3.92 (s, 3H), 3.66 (s, 2H), 3.33 (s, 2H), 1.60-1.42 (m, 2H), 1.42-1.28 (m, 2H), 0.71 (t,  $J = 9.6$  Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 458,1 ( $\text{M}^+ + 2$ ), Rt. 2,94 min, 95,31% (Máx).

### Intermedio 34

#### 1,1-dióxido de 3,3-Dietil-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina

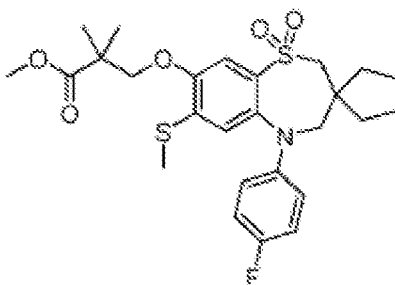


A una solución agitada de 1,1-dióxido de 7-bromo-3,3-diethyl-5-(4-fluorofenil)-8-metoxi-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 33; 10,0 g, 0,02 mol) en DMF (100 mL), se añadió tiometoxido sódico (7,67 g, 0,11 mol) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante 16 horas a 70 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se apagó con agua (100 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 36-50% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 88% (7,90 g, sólido blanquecino).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.54 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.09-6.99 (m, 2H), 6.99-6.91 (m, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.72-3.50 (m, 2H), 3.25-3.18 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.65-1.46 (m, 2H), 1.43-1.25 (m, 2H), 0.74 (t, J = 7.20 Hz, 6H). LCMS (Método I) 410,0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,46 min, 92,37% (Máx). HPLC: (Método E) Rt. 5,33 min, 94,90% (Máx).

### Intermedio 35

**3-((3,3-Diethyl-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoato de metilo**

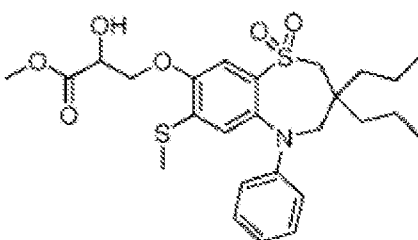


A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3,3-diethyl-5-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-7-(metiltio)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 35; 300 mg, 0.73 mmol) en THF (10 mL), se añadieron metil-3-hidroxi-2,2-dimetilpropanoato (96 mg, 0,73 mmol), trifetilfosfina (288 mg, 1,09 mmol) y DBAD (336 mg, 1,46 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua (10 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (25 mL) y salmuera (25 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10-20% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 78% (300 mg, goma blanca).

LCMS (Método E) 524.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,17 min, 93,5% (Máx).

### Intermedio 36

**2-Hidroxi-3-((7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)propanoato de metilo**

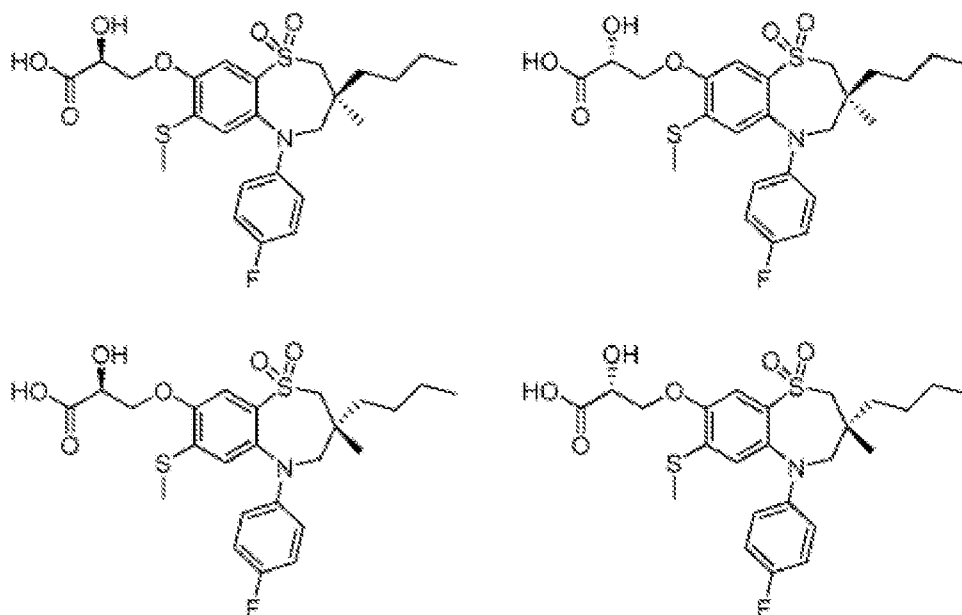


A una solución agitada de 1,1-dióxido de 8-hidroxi-7-(metiltio)-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (500 mg, 1,19 mmol) en DMF (10 mL) se añadieron  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (777 mg, 2,38 mmol) y oxirano-2-carboxilato de metilo (365 mg, 3,57 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 4 días a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC; ~50% de conversión), la mezcla de reacción se apagó con HCl diluido (1,5 N, 10 mL) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 30-40% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 24% (150 mg, goma amarilla).

**LCMS** (Método K) 521.9 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 3,03 min, 95,10% (Máx).

### Ejemplo 1

**Ácido 3-((3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetra hidro-1, 5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxi-propanoico** (*diastereómeros individuales*)



#### Diastereómero 1

A una solución agitada del diastereómero 1 de 3-((3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxi-propanoato de metilo (Intermedio 7; 80 mg, 0,15 mmol) en 1,4-dioxano (1 mL), se añadió HCl aq. (6 N, 3 mL) y la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua (5 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 10-20% MeOH/DCM; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base.

Los diastereómeros 2, 3 y 4 del compuesto base se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento, partiendo de 80 a 85 mg de los diastereómeros 2, 3 y 4 del intermedio 7, respectivamente.

**Diastereómero 1: Rendimiento:** 32% (25 mg, sólido blanco).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.36 (s, 1H), 7.07-6.99 (m, 4H), 6.73 (s, 1H), 4.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 3.69-3.52 (m, 2H), 3.31-3.22 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.55-1.38 (m, 1H), 1.30-1.10 (m, 5H), 0.99 (s, 3H), 0.76 (t,  $J = 8.4$  Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 512.0 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,83 min, 98,75% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,10 min, 98,25% (Máx). **SFC Quiral:** (Método G) Rt. 2,59 min, 99,42% (Máx).

**Diastereómero 2: Rendimiento:** 32% (25 mg, sólido blanco).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.35 (s, 1H), 7.06-6.98 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 4.35 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 3.62 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.55-1.39 (m, 1H), 1.35-1.05 (m, 5H), 1.03 (s, 3H), 0.79 (t,  $J = 8.4$  Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 512.0 ( $\text{M}^+\text{H}$ ), Rt. 2,82 min, 99,25% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,11 min, 98,71% (Máx). **SFC Quiral:** (Método G) Rt. 4,19 min, 99,14% (Máx).

**Diastereómero 3: Rendimiento:** 49% (40 mg, sólido blanquecino).  **$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7.36 (s, 1H), 7.07-6.98 (m, 4H), 6.72 (s, 1H), 4.33-4.30 (m, 1H), 4.21-4.15 (m, 2H), 3.88-3.44 (m, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.46-1.33

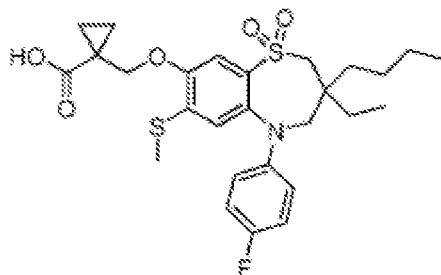
(m, 1H), 1.32-1.10 (m, 5H), 1.04 (s, 3H), 0.80 (t, J = 7.2 Hz, 3H). **LCMS** (Método E) 512.0 (M<sup>+</sup>H), Rt. 2,83 min, 98,66% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,10 min, 98,19% (Máx). **SFC Quiral**: (Método G) Rt. 2,50 min, 99,54% (Máx).

Diastereómero 4: **Rendimiento**: 52% (40 mg, sólido blanquecino). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.36 (s, 1H), 7.07-6.98 (m, 4H), 6.73 (s, 1H), 4.33 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.17-4.11 (m, 2H), 3.90-3.45 (m, 2H), 3.33-3.30 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.58-1.39 (m, 1H), 1.33-1.08 (m, 5H), 1.00 (s, 3H), 0.80 (t, J = 7.2 Hz, 3H). **LCMS** (Método H) 512,2 (M<sup>+</sup>H), Rt. 2,06 min, 96,13% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,10 min, 96,16% (Máx). **SFC Quiral**: (Método G) Rt. 3,88 min, 99,19% (Máx).

Se desconoce la configuración absoluta de los cuatro diastereómeros.

## Ejemplo 2

**Ácido 1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1, 1-dioxido-2,3,4,5-tetra hidro-1, 5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico**

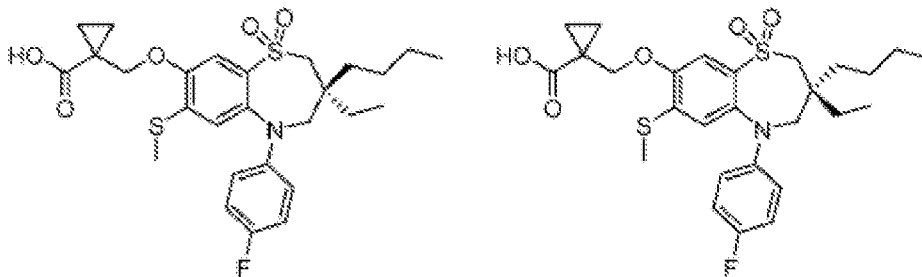


A una solución agitada de 1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxilato de etilo (Intermedio 15; 240 mg, 0,42 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (7:3, 10 mL) se añadió hidróxido de litio (36 mg, 0,85 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~4) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se trituró con hexano y se filtró para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 22% (50 mg, sólido blanco).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.42 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.05-7.07 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.84-3.54 (bs, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.59-1.36 (m, 4H), 1.35-0.98 (m, 8H), 0.79-0.69 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 536.2 (M<sup>+</sup>H), Rt. 2,92 min, 98,33% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,91 min, 96,58% (Máx).

## Ejemplo 3

**(Ácido (S)-1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1, 1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1, 5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico y ácido (R)-1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1, 1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1, 5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico, 1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-ácido carboxílico**



Los dos enantiómeros del ácido 1-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico racémico (Ejemplo 2; 40 mg, 0,074 mmol) se separaron por SFC quiral (Método O). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al enantiómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al enantiómero 2. Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

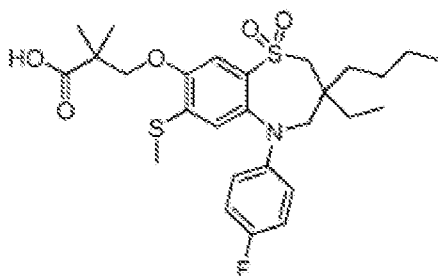
Enantiómero 1: **Rendimiento**: 32% (13 mg, sólido blanquecino). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.40 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.06 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.65 (bs, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.45-1.35 (m, 4H), 1.24-

1.19 (m, 3H), 1.11-1.07 (m, 5H), 0.82-0.68 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 536.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,91 min, 97,46% (Máx). **HPLC**: (Método E) Rt. 5,99 min, 96,04% (Máx). **SFC Quiral**: (Método O) Rt. 2,74 min, 97,81% (Máx).

Enantiómero 2: **Rendimiento**: 10% (4 mg, sólido blanquecino). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.41 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.66 (bs, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.51-1.36 (m, 4H), 1.31-1.24 (m, 3H), 1.11-1.07 (m, 6H), 0.80-0.70 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 536.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,07 min, 95,83% (Máx). **HPLC**: (Método E) Rt. 5,995 min, 95,29% (Máx). **SFC Quiral**: (Método O) Rt. 3,70 min, 99,39% (Máx).

#### Ejemplo 4

**Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico**

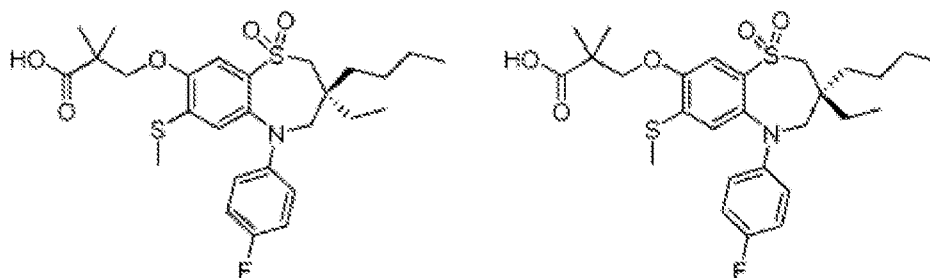


A una solución agitada de 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoato de metilo (Intermedio 16; 300 mg, 0,54 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (7:3, 10 mL) se añadió hidróxido de litio (45 mg, 1,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~4) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 9% MeOH/DCM; gel de sílice: 230-400 mesh) y el residuo obtenido se purificó de nuevo por HPLC preparativa (método A) para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 41% (130 mg, sólido blanco).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.07-7.05 (m, 4H), 6.26 (s, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.67 (bs, 2H), 3.34-3.28 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.50-1.34 (m, 4H), 1.25 (s, 6H), 1.22-1.04 (m, 4H), 0.78-0.72 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 538.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,13 min, 97,56% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,04 min, 96,19% (Máx).

#### Ejemplo 5

**(S)-3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico y ácido (R)-3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico**



Los dos enantiómeros del ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico racémico (Ejemplo 4; 100 mg, 0,18 mmol) se separaron por SFC (método H). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al enantiómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al enantiómero 2. Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

Enantiómero 1: **Rendimiento**: 33% (33 mg, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.07 (t, J = 8.00 Hz, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.31-1.33 (m, 10H), 1.02-1.04 (m, 4H), 0.73-0.75 (m, 6H). **LCMS** (Método H) 538,5 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,33 min, 96,81% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,05 min, 95,30% (Máx). **SFC Quiral**: (Método H) Rt. 3,35 min, 99,93% (Máx).

Enantiómero 2: **Rendimiento**: 26% (26 mg, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.40 (s, 1H), 7.27 (s, 1H),

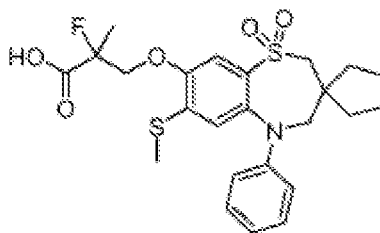
7.05-7.07 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.31-1.33 (m, 11H), 1.02-1.04 (m, 4H), 0.73-0.75 (m, 6H). **LCMS** (Método H) 538,5 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,33 min, 97,41% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,02 min, 95,58% (Máx). **SFC Quiral**: (Método H) Rt. 2,74 min, 99,96% (Máx).

5

**Ejemplo 6**

**Ácido** 3-((3,3-di-etil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico

10



15

20

A una solución agitada de 1,1-dióxido de 3,3-di-etil-8-(2-hidroxi-2-metoxi-propoxi)-7-(metiltio)-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepina (Intermedio 18; 30 mg, 0,05 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (2:3, 5 mL) se añadió hidróxido de litio (4,9 mg, 0,11 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~4) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 9% MeOH/DCM; gel de sílice: 230-400 mesh) y el residuo obtenido se purificó de nuevo por HPLC preparativa (método A) para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 68% (20 mg, sólido blanco).

25

30

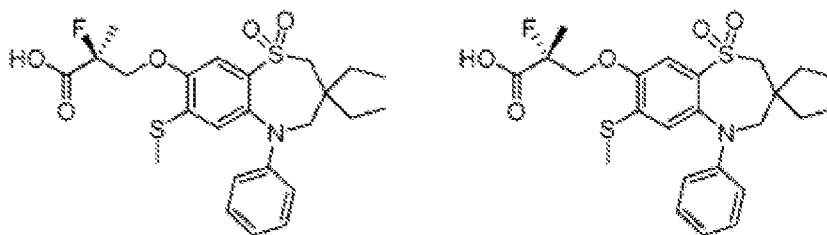
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 13.53 (bs, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.22 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.84 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.49-4.38 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.62- 1.57 (m, 5H), 1.37-1.32 (m, 2H), 0.75 (t, J = 7.2 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 496.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,84 min, 99,03% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 5,25 min, 97,49% (Máx).

35

**Ejemplo 7**

**Ácido** (S)-3-((3,3-di-etil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico y ácido (R)-3-((3,3-di-etil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico

40



45

50

Enantiómero 1:

A una solución agitada del enantiómero 1 de 3-((3,3-di-etil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoato de metilo (Intermedio 18; 30 mg, 0,07 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (2:3, 5 mL) se añadió hidróxido de litio (5 mg, 0,11 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~4) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 5 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 9% MeOH/DCM; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base.

55

60

[2] El enantiómero 30 del compuesto base se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento, partiendo de 2 mg de enantiómero 18 del intermedio 11.

65

Enantiómero 1: **Rendimiento**: 77% (22 mg, sólido blanco). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 13.54 (bs, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.22 (dd, J = 7.2, 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.84 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.47- 4.38 (m, 2H), 3.67 (s,

2H), 3.26 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.62-1.57 (m, 5H), 1.37-1.32 (m, 2H), 0.75 (t, J = 7.2 Hz, 6H). **LCMS:** (Método E) 496.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,64 min, 98,33% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,35 min, 98,75% (Máx). SFC quiral (método G): Rt. 1.80 min, 98.82% (Max).

5 Enantiómero 2: **Rendimiento:** 77.54% (22 mg, sólido blanco). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 13.52 (bs, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.22 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.84 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.47-4.38 (m, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.62-1.57 (m, 5H), 1.37-1.32 (m, 2H), 0.75 (t, J = 7.2 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 496.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,64 min, 98,23% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,35 min, 98,42% (Máx). SFC quiral (método G): rt 2,58 min, 98,47% (Máx).

10

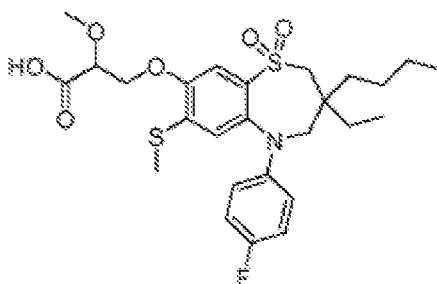
Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

### Ejemplo 8

15

**Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetra hidro-1, 5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico**

20



25

30 A una solución agitada de 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoato de metilo (Intermedio 20; 60 mg, 0,10 mmol) en 1,4-dioxano (1,5 mL) se añadió hidróxido de litio (5,19 mg, 0,217 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, 2 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El crudo obtenido se purificó por prep-HPLC (método A) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 27% (16 mg, sólido blanco).

35

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13.20 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.07 (d, J = 7.20 Hz, 4H), 6.62 (s, 1H), 4.36- 4.09 (m, 3H), 3.65 (bs, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.52-1.37 (m, 4H), 1.11-0.99 (m, 4H), 0.77-0.72 (m, 6H). **LCMS** (Método E) 540.0 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,97 min, 98,12% (Máx). **HPLC:** (Método B) Rt. 5,59 min, 99,49% (Máx).

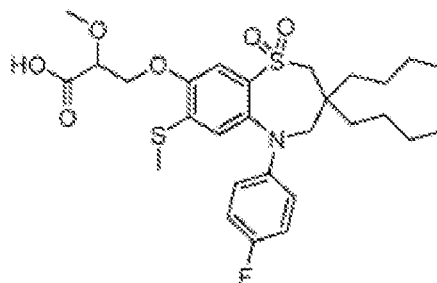
40

### EJEMPLO 9:

45

**Ácido 3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico**

50



55

60 A una solución agitada de 3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2, 3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoato de metilo (Intermedio 26; 50 mg, 0,08 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (3 mL) se añadió hidróxido de litio (7,22 mg, 0,17 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, 2 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El crudo obtenido se purificó por prep-HPLC (método A) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 24% (12 mg, sólido blanco).

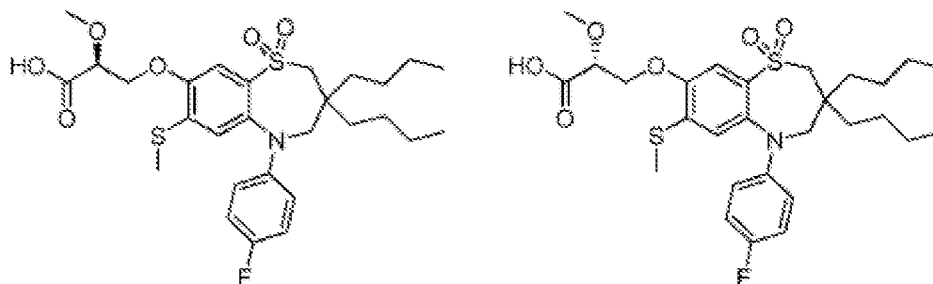
65

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13.06 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.09 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 6.59 (s, 1H), 4.36- 4.33 (m, 1H),

4.27-4.23 (m, 1H), 4.12 (bs, 1H), 3.64 (bs, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.37-1.34 (m, 4H), 1.24-1.02 (m, 8H), 0.76 (t, J = 6.80 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 568.1 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,15 min, 98,26% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,07 min, 97,56% (Máx).

## 5 Ejemplo 10

**Ácido (S)-3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico y ácido (R)-3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico**



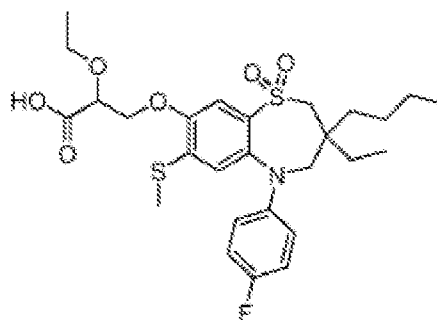
Los dos enantiómeros del ácido 3-((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico racémico (Ejemplo 9; 30 mg, 5,29 mmol) se separaron por SFC quiral (método H). El material se concentró al vacío a 40 °C. La primera fracción de elución correspondió al enantiómero 1 y la segunda fracción de elución correspondió al enantiómero 2. Se desconoce la configuración absoluta de los dos enantiómeros.

Enantiómero 1: **Rendimiento**: 16% (5.0 mg, sólido blanco). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13.12 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.09 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 6.59 (s, 1H), 4.35-4.33 (m, 1H), 4.27-4.23 (m, 1H), 4.15-4.13 (m, 1H), 3.62 (bs, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.38 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.41-1.37 (m, 6H), 1.35-1.03 (m, 6H), 0.76 (t, J = 6.40 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 568.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,78 min, 94,49% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,09 min, 97,7% (Máx). **SFC Quiral**: (Método H) Rt. 3,55 min, 99,58% (Máx).

Enantiómero 2: **Rendimiento**: 26% (8 mg, sólido blanco). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13.05 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.09 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 6.59 (s, 1H), 4.36-4.33 (m, 1H), 4.27-4.23 (m, 1H), 4.15-4.13 (m, 1H), 3.62 (bs, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (s, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.41-1.30 (m, 6H), 1.30-1.02 (m, 6H), 0.76 (t, J = 6.80 Hz, 6H). **LCMS** (Método E) 568.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,78 min, 87,94% (Máx). **HPLC**: (Método B) Rt. 6,09 min, 90,72% (Máx). **SFC Quiral**: (Método H) Rt. 4,32 min, 95,74% (Máx).

## 40 Ejemplo 11

**Ácido 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoico**



A una solución agitada de 3-((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoato de metilo (Intermedio 28; 97 mg, 0,17 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (7:3, 4 mL) se añadió hidróxido de litio (14 mg, 0,34 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~3) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se trituró con hexano, se filtró y se secó al vacío para obtener el compuesto base. **Rendimiento**: 40% (20 mg, sólido blanco).

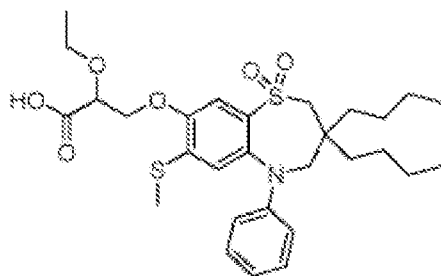
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.91 (bs, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.08-7.06 (m, 4H), 6.62 (s, 1H), 4.35-4.33 (m, 1H), 4.28-4.24 (m, 2H), 3.72-3.68 (m, 2H), 3.57-3.52 (m, 2H), 3.29-3.21 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.59-1.33 (m, 4H), 1.22-0.95 (m, 7H), 0.79-0.68 (m, 6H). LCMS (Método E) 554.3 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,87 min, 99,83% (Máx). HPLC: (Método B) Rt. 5,89 min, 97,41% (Máx).

5

## Ejemplo 12

Ácido 3-((3,3-dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoico

10



15

20

A una solución agitada de 3-((3,3-dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoato de metilo (Intermedio 30; 50 mg, 0,08 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (5:1, 3 mL), se añadió hidróxido de litio (7,2 mg, 0,17 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, 2 mL) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con agua (5 mL) y salmuera (5 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La parte orgánica se filtró y se concentró al vacío. El crudo obtenido se purificó por prep-HPLC (método A) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 51% (25 mg, sólido blanco).

25

30

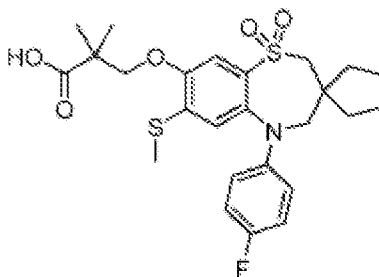
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.38 (s, 1H), 7.23 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.88 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.36-4.34 (m, 1H), 4.27-4.23 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.43-1.36 (m, 2H), 1.33-1.24 (m, 3H), 1.17-1.03 (m, 10H), 0.77 (t, J = 6.80 Hz, 6H). LCMS (Método E) 564.3 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 3,08 min, 99,82% (Máx). HPLC: (Método B) Rt. 6,39 min, 97,45% (Máx).

35

## Ejemplo 13

Ácido 3-((3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico

40



45

50

A una solución de 3-((3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoato de metilo (Intermedio 35; 300 mg, 0,57 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (7:3, 10 mL) se añadió hidróxido de litio (48 mg, 1,14 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido (1,5 N, pH~3) y se diluyó con agua helada (2 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 X 10 mL), y la capa orgánica combinada se lavó con agua (20 mL) y salmuera (20 mL). La parte orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se trituroó con hexano y se filtró para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 15% (45 mg, sólido blanco).

55

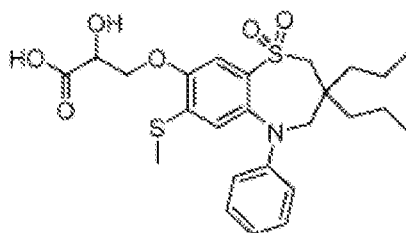
60

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.43 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.09-7.02 (m, 4H), 6.66 (s, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.69 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.55-1.49 (m, 2H), 1.38-1.31 (m, 2H), 1.25 (s, 6H), 0.74 (t, J = 7.6 Hz, 6H). LCMS (Método E) 510.2 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,78 min, 98,4% (Máx). HPLC: (Método B) Rt. 5,55 min, 96,41% (Máx).

65

## Ejemplo 14

**Ácido 2-hidroxi-3-((7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)propanoico**



A una solución agitada de 2-hidroxi-3-((7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)propanoato de metilo (Intermedio 36; 150 mg, 0,29 mmol) en 1,4-dioxano (5 mL), se añadió HCl 6N (3 mL) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 100 °C. Una vez completada la reacción (controlada por TLC), la mezcla de reacción se diluyó con agua (10 mL) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna Isolera (eluyente: 40-50% EtOAc/PE; gel de sílice: 230-400 mesh) para obtener el compuesto base. **Rendimiento:** 46% (70 mg, sólido blanco).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.81 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.23 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.87 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 5.80-5.40 (m, 1H), 4.42-4.32 (m, 1H), 4.32-4.15 (m, 2H), 3.88- 3.58 (m, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.52-1.35 (m, 2H), 1.32-1.12 (m, 6H), 0.70 (t, J = 6.80 Hz, 6H). **LCMS** (Método K) 507.9 (M<sup>+</sup>+H), Rt. 2,69 min, 97,77% (Máx). **HPLC:** (Método E) Rt. 5,32 min, 95,61% (Máx).

#### ENSAYOS BIOLÓGICOS

##### *Protocolo de ensayo IBAT (h/m)*

Se sembraron 10.000 células (células humanas o de ratón que sobreexpresan IBAT) en una placa de 96 pocillos (Corning CLS3809) en 200 µL de medio MEM-alfa (Gibco 12571-063) suplementado con un 10% de FBS (Gibco 10438026) que contenía puromicina (Gibco A1113803) (10 µg/mL) y se incubaron a 37 °C en un 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Tras la incubación, se decantó el medio de los pocillos y las células se lavaron dos veces con 300 µL de medio basal MEM-alfa (sin FBS). Tras decantar cada vez el medio basal MEM-alfa, se golpearon las placas contra papel de cocina para garantizar la máxima eliminación de los medios residuales.

Se añadieron diluciones del inhibidor de prueba (siendo la concentración de prueba más alta 10 µM, dilución en serie triple, 10 puntos) preparadas en DMSO (Sigma D2650) en mezcla de incubación (manteniendo una concentración final de DMSO del 0,2%) que contenía 0,25 µM de ácido 3H-taurocólico (ARC ART-1368) y 5 µM de ácido taurocólico frío (Sigma T4009). A continuación, se añadieron a los pocillos (por duplicado) 50 µL de mezcla de incubación que contenía inhibidores de prueba y se incubaron las placas durante 20 minutos en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras la incubación, se detuvo la reacción manteniendo las placas en una mezcla de agua helada durante 2-3 minutos y, a continuación, se aspiró completamente la mezcla de incubación de los pocillos. Los pocillos se lavaron dos veces con 250 µL de ácido taurocólico no marcado refrigerado 1 mM disuelto en HEPES (Gibco 15630080) tamponado (10 mM) HBSS (Gibco 14175079) (pH 7,4). Las placas se golpearon contra una toalla de papel después de cada lavado para garantizar la máxima eliminación del tampón de bloqueo.

Se añadieron 20 µL de MicroScint-6013621 (PerkinElmer 120) a los pocillos y se mantuvieron durante toda la noche a temperatura ambiente antes de leer las placas en el TopCount NXT™ Microplate Scintillation and Luminescence Counter de PerkinElmer según el protocolo de prueba 3H (ajustado a un tiempo de lectura de 120 segundos por pocillo).

##### *Protocolo de ensayo LBAT (h/m)*

Se sembraron 20.000 células (células humanas o de ratón que sobreexpresan LBAT) en una placa de 96 pocillos (Corning CLS3809) en 100 µL de medio MEM-alfa (Gibco 12571-063) suplementado con un 10% de FBS (Gibco 10438026) que contenía Geneticina (Gibco 10131-027) (1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C en un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras la incubación, se decantó el medio de los pocillos y las células se lavaron dos veces con 300 µL de medio basal MEM-alfa (sin FBS). Tras decantar cada vez el medio basal MEM-alfa, se golpearon las placas contra papel de cocina para garantizar la máxima eliminación de los medios residuales.

Para la LBAT humana, la mezcla de incubación se preparó añadiendo diluciones del inhibidor de ensayo (dilución en serie triple en DMSO (Sigma D2650), 10 puntos) en MEM-alfa (sin FBS) que contenía 0,3 µM de ácido 3H-taurocólico (ARC ART-1368) y 7,5 µM de ácido taurocólico frío (Sigma T4009) (manteniendo una concentración final de DMSO del 0,2%). Para LBAT de ratón, la mezcla de incubación se preparó añadiendo diluciones del inhibidor de ensayo (dilución en serie de 3 veces en DMSO, 10 puntos) en MEM-alfa (sin FBS) que contenía 0,3 µM de ácido 3H-taurocólico y 25 µM de ácido

taurocólico frío manteniendo una concentración final de DMSO del 0,2%).

A continuación, se añadieron a los pocillos (por duplicado) 50 µL de mezcla de incubación que contenía inhibidores de prueba y se incubaron las placas durante 20 minutos en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras la incubación, se detuvo la reacción manteniendo las placas en una mezcla de agua helada durante 2-3 minutos y, a continuación, se aspiró completamente la mezcla de incubación de los pocillos. Los pocillos se lavaron dos veces con 250 µL de ácido taurocólico no marcado refrigerado 1 mM disuelto en HEPES (Gibco 15630080) tamponado (10 mM) HBSS (Gibco 14175079) (pH 7,4). Las placas se golpearon contra una toalla de papel después de cada lavado para garantizar la máxima eliminación del tampón de bloqueo.

Se añadieron 100 µL de MicroScint-20 (PerkinElmer 6013621) a los pocillos y se mantuvieron durante toda la noche a temperatura ambiente antes de leer las placas en el TopCount NXT™ Microplate Scintillation and Luminescence Counter de PerkinElmer según el protocolo 3H Test (ajustado a 120 segundos de tiempo de lectura por pocillo, con orientación normal de la placa).

#### *Ensayo de permeabilidad bidireccional (células Caco-2)*

Las células Caco-2 (Evotec) se sembraron a una densidad de 70.000 células/pocillo en placas de cultivo celular Millicell® de 24 pocillos y se mantuvieron en una incubadora (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% HR) durante 21 días con cambio de medio en días alternos.

Se prepararon soluciones madre (10 mM) de los compuestos de ensayo, atenolol (marcador de baja permeabilidad), propranolol (marcador de alta permeabilidad) y digoxina (sustrato de la vía de transporte P-gp) en dimetilsulfóxido (DMSO). Se preparó una solución madre intermedia (1 mM) diluyendo 10 µL de solución madre maestra 10 mM con 90 µL de DMSO puro. Se preparó una solución madre de trabajo (10 µM) diluyendo 50 µL de 1 mM con 4950 µL de tampón FaSSIF. Tras la adición de los compuestos a la FaSSIF, las muestras se sometieron a sonicación durante 2 horas y se centrifugaron a 4000 RPM durante 30 minutos a 37 °C. Los 4 mL de sobrenadante resultante se utilizaron directamente en el ensayo. La concentración final de DMSO en los experimentos de transporte fue del 1%.

El día del ensayo, las monocapas Caco-2 se lavaron dos veces con tampón de transporte (HBSS, pH 7,4) y se preincubaron durante 30 min (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% HR) en una incubadora. La resistencia eléctrica de las monocapas se midió con un sistema Millicell® - ERS. Para el ensayo se seleccionaron monocapas con valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) superiores a 350 ohm.cm<sup>2</sup>.

El ensayo se realizó en dirección absorbente (A2B) y secretora (B2A). Los experimentos de transporte se iniciaron mediante la adición de tampón de ensayo de transporte (tampón FaSSIF preparado en HBSS) consistente en compuestos al compartimento donante (cámara apical A-B; cámara basolateral B-A) en pocillos duplicados (n=2). Se introdujo tampón HBSS sin fármaco (pH 7,4) con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) en los compartimentos receptores (A-B-basolateral; B-A- Apical). Los volúmenes de los compartimentos apical y basolateral fueron de 0,4 y 0,8 mL, respectivamente. Tras añadir la solución dosificadora, las placas se incubaron en una incubadora durante 120 minutos a 37 °C. Transcurridos 120 minutos, se recogieron las muestras de donante y receptor y se emparejaron matricialmente (1:1, 30 µL de muestra de estudio + 30 µL de tampón blanco) con el tampón opuesto. Matriz de muestras de dosificación emparejada (1:1, 30 µL de muestra de estudio + 30 µL de tampón blanco) con el tampón opuesto. Las muestras se procesaron añadiendo acetonitrilo con patrón interno (60 µL de muestra de estudio + 200 µL de acetonitrilo con patrón interno -Tolbutamida, 500 ng/mL).

Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido (100 µL) se diluyó con 100 µL de agua y se transfirió a placas de 96 pocillos nuevas. La concentración de los compuestos en las muestras se analizó mediante el método de cromatografía líquida en tándem por espectrometría de masas (LC-MS/MS) utilizando el método bioanalítico de grado de descubrimiento, según procediera.

La permeabilidad aparente media ( $P_{app}$ , x 10<sup>-6</sup> cm/seg) de los compuestos de ensayo, atenolol, propranolol y digoxina se calculó de la siguiente manera:

$$P_{app} = \frac{dq}{dt} \times \frac{1}{C_0} \times \frac{1}{A}$$

donde dq/dt = velocidad de transporte (velocidad de transporte del compuesto en el compartimento receptor), C<sub>0</sub> = concentración inicial en el compartimento donante, A = superficie de la membrana filtrante efectiva.

#### *Protocolo de ensayo basado en HepaRG*

Un vial crioconservado de células HepaRG diferenciadas (Biopredic International HPR116080) se descongela en HepaRG Thawing/Plating/General Purpose Medium (Biopredic International ADD670C) suplementado con 200 mM Glutamax (Gibco 35050061) siguiendo el protocolo proporcionado por Biopredic International. Se siembran 70.000 células por pocillo

5 en una placa de 96 pocillos (Corning CLS3809) en 100  $\mu$ L de HepaRG Thawing/Plating/General Purpose Medium suplementado con 200 mM de Glutamax y se incuban a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras la incubación, el medio de siembra se sustituye por un medio de mantenimiento/metabolismo HepaRG (Biopredic International ADD620C) y se incuba durante 6 días, con reposición de medio de mantenimiento/metabolismo HepaRG fresco cada 48 horas. Tras 7 días de incubación después de la siembra, se decanta el medio de incubación de los pocillos y se lavan las células dos veces con 250  $\mu$ L de medio basal William's E (Gibco 12551032). Después de decantar cada vez el medio basal William's E, se golpean las placas contra una toalla de papel para garantizar la máxima eliminación de los medios residuales. La mezcla de incubación se prepara añadiendo diluciones del inhibidor de ensayo (dilución en serie de 3 veces en DMSO (Sigma D2650)) en medio E de William (basal) que contiene 0,3  $\mu$ M de ácido 3H-taurcólico (ARC ART-1368) y 7,5  $\mu$ M de ácido taurcólico frío (Sigma T4009) (manteniendo una concentración final de DMSO del 0,2%). A continuación, se añaden a los pocillos (por duplicado) 50  $\mu$ L de mezcla de incubación que contiene los inhibidores de la prueba y se incuban las placas durante 30 minutos en una incubadora con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Tras la incubación, se detiene la reacción manteniendo las placas en una mezcla de agua helada durante 2-3 minutos y, a continuación, se aspira completamente la mezcla de incubación de los pocillos. Los pocillos se lavan dos veces con 250  $\mu$ L de ácido taurcólico no marcado refrigerado 1 mM disuelto en HEPES (Gibco 15630080) tamponado (IOMM) HBSS (Gibco 14175079) (pH 7,4). Las placas se golpean contra una toalla de papel después de cada lavado para garantizar la máxima eliminación del tampón de bloqueo.

20 Se añaden 100  $\mu$ L de MicroScint-20 (PerkinElmer 6013621) a los pocillos y se mantienen durante toda la noche a temperatura ambiente antes de leer las placas en el TopCount NXT™ Microplate Scintillation and Luminescence Counter de PerkinElmer según el protocolo 3H Test (ajustado a 120 segundos de tiempo de lectura por pocillo, con orientación normal de la placa).

#### 25 *Preparación de diluciones del compuesto de ensayo*

25 Todos los compuestos de ensayo se suministraron en forma de polvo a temperatura ambiente. Se prepararon reservas de DMSO 10 mM de los compuestos de ensayo, se tomaron alícuotas y se almacenaron a -20 °C. A partir de la reserva de DMSO 10 mM de los compuestos, se preparó una dilución en serie triple en DMSO para obtener un total de 10 diluciones de los compuestos de ensayo. Se añadieron 0,5  $\mu$ L de esta dilución en DMSO a 250  $\mu$ L de medio basal sin FBS que contenía ácido 3H-taurcólico y ácido taurcólico frío para preparar la mezcla de incubación.

#### 30 *Estudios de biodisponibilidad*

35 Se utilizaron ratones machos (C57BL/6 o CD1) o ratas Wistar de 8-9 semanas de edad. Para cada compuesto de ensayo, se utilizaron dos grupos de 3 animales cada uno. A un grupo se le administró una dosis única intravenosa de 1 mg/kg (vehículo 100% DMSO) a través de la vena de la cola y al otro grupo se le administró una dosis única oral de 10 mg/kg a través de aguja gavage. El grupo al que se administró una dosis oral pasó la noche en ayunas. Se recogieron muestras de sangre después de 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas tras la administración intravenosa, y después de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas tras la administración oral. Se tomaron muestras de sangre de la vena safena. Como anticoagulante se utilizó EDTA al 0,2%. Las muestras se analizaron mediante un método bioanalítico de grado de descubrimiento desarrollado para la estimación del compuesto de ensayo en plasma, utilizando un sistema LC-MS/MS.

#### 40 *Resultados*

45 Los datos biológicos de los compuestos de los ejemplos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8**

Ejemplo	IC <sub>50</sub> hLBAT (nM)	IC <sub>50</sub> hIBAT (nM)	Permeabilidad (Caco-2)	
			Papp A2B (x 10 <sup>-6</sup> cm/sec)	ER
1, diastereómero 1	1644	1	2,2	3,4
1, diastereómero 2	2022	2		

Ejemplo	IC <sub>50</sub> hLBAT (nM)	IC <sub>50</sub> hIBAT (nM)	Permeabilidad (Caco-2)	
			Papp A2B (x 10 <sup>-6</sup> cm/sec)	ER
1, diastereómero 3	921	61		
1, diastereómero 4	1051	122		
2	320	11		
3, enantiómero 1	903	3		
3, enantiómero 2	1084	258		
4	173	37		
5, enantiómero 1	138	7		
5, enantiómero 2	119	770		
6	83	338		
7, enantiómero 1	50	175		
7, enantiómero 2	472	701		
8	2990	4		
9	5413	10		
10, enantiómero 1	>6666	40		
10, enantiómero 2	>2222	4		
11	2222	10		
12	1247	3		
13	21	256		
14	3683	30		

*Modelo PD: Evaluación del compuesto de ensayo sobre los niveles totales de ácidos biliares en ratones C57BL/6 macho.*

Se utilizan ratones C57BL/6N Tac de 8-9 semanas de edad para estudiar el efecto de los moduladores de ácidos biliares en los niveles de ácidos biliares. Una vez finalizado el periodo de cuarentena y aclimatación, los animales se distribuyen aleatoriamente en función de su peso corporal en x grupos experimentales: (i) control con vehículo, y (ii) compuesto de ensayo y mg/kg po una vez al día. Los animales son tratados con el compuesto de ensayo durante 7 días. El día 5 del estudio, los animales se alojan individualmente en jaulas nuevas. El día 7, se recogen las heces de cada jaula y, a continuación, se extrae sangre de cada animal por vía retroorbital. Los animales son eutanasiados para recoger hígado e íleon terminal de cada animal para su posterior análisis. El peso corporal y el consumo de alimentos se miden dos veces por semana. Los perfiles de lípidos séricos se analizan en muestras de suero del día 7. Los ácidos biliares totales en suero se miden en las muestras de suero del día 7. La excreción fecal de bilis se mide en la muestra fecal del día 7. La expresión hepática de CYP7A1 y SHP se cuantifica en las muestras de hígado del día 7. Los triglicéridos hepáticos y el colesterol total se analizan en las muestras de hígado del día 7.

*Modelo de ácido biliar en orina: Evaluación de compuestos de ensayo sobre los niveles de ácidos biliares en orina en ratones C57BL/6 macho.*

Se utilizan ratones C57BL/6N Tac de 8-9 semanas de edad para estudiar el efecto de los moduladores de ácidos biliares en los niveles de ácidos biliares. Una vez finalizado el periodo de cuarentena y aclimatación, los animales se distribuyen aleatoriamente en función de su peso corporal en x grupos experimentales: (i) control con vehículo, y (ii) compuesto de ensayo y mg/kg po una vez al día. Los animales son tratados con el compuesto de ensayo durante 7 días. El día 6 del estudio, los animales son trasladados a una jaula metabólica. El día 7, se recogen las heces y la orina de cada jaula metabólica y, a continuación, se extrae sangre de cada animal por vía retroorbital. Los animales son eutanasiados para

## ES 3 002 777 T3

recoger el riñón de cada animal para su posterior análisis. El peso corporal se mide dos veces por semana. Los ácidos biliares totales en suero se miden en muestras de suero del día 7. La excreción fecal de ácidos biliares se mide en la muestra fecal del día 7. La excreción urinaria de ácidos biliares se mide en la muestra del día 7. La expresión renal de ASBT, OSTa, OSTAb y MRP2 se cuantifica en las muestras del día 7.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo formado por:

- 5           Ácido (S)-3-(((S)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;  
 Ácido (S)-3-(((R)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;  
 10          Ácido (R)-3-(((S)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;  
 Ácido (R)-3-(((R)-3-butil-5-(4-fluorofenil)-3-metil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-hidroxiopropanoico;  
 Ácido           1-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;  
 15          (S)-1-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;  
 Ácido           (R)-1-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico;  
 Ácido           3-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;  
 20          (S)-3-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;  
 Ácido           (R)-3-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico;  
 25          Ácido           3-(((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico;  
 Ácido           (S)-3-(((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico;  
 30          Ácido (R)-3-(((3,3-dietil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-fluoro-2-metilpropanoico;  
 Ácido           3-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;  
 Ácido           3-(((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;  
 35          Ácido (S)-3-(((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;  
 Ácido (R)-3-(((3,3-dibutil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;  
 ácido           3-(((3-butil-3-etil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-metoxipropanoico;  
 40          Ácido 3-(((3,3-dibutil-7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2-etoxipropanoico;  
 Ácido           3-(((3,3-dietil-5-(4-fluorofenil)-7-(metiltio)-1,1-dioxido-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)-2,2-dimetilpropanoico; y  
 45          Ácido           2-hidroxi-3-(((7-(metiltio)-1,1-dioxido-5-fenil-3,3-dipropil-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-8-il)oxi)propanoico;  
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

50          3. El compuesto según la reivindicación 1, para uso como medicamento.

4. El compuesto según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular como hipercolesterolemia; diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2; cataratas; enfermedades micro y macrovasculares; retinopatía; neuropatía; nefropatía y retraso en la cicatrización de heridas; isquemia tisular; pie diabético; arteriosclerosis; infarto de miocardio; síndrome coronario agudo; angina de pecho inestable; angina de pecho estable; accidente cerebrovascular; enfermedad oclusiva arterial periférica; cardiomiopatía; insuficiencia cardíaca; trastornos del ritmo cardíaco y reestenosis vascular; resistencia a la insulina (alteración de la homeostasis de la glucosa); hiperglucemia; hiperinsulinemia; niveles sanguíneos elevados de ácidos grasos o glicerol; obesidad; dislipidemia; hiperlipidemia, incluida la hipertrigliceridemia; síndrome metabólico (síndrome X); aterosclerosis; hipertensión; y para aumentar los niveles de lipoproteínas de alta densidad.

5. El compuesto según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal, como estreñimiento (incluyendo estreñimiento crónico, estreñimiento funcional, estreñimiento idiopático crónico (CIC), estreñimiento intermitente/espórado, estreñimiento secundario a la diabetes mellitus, estreñimiento secundario a un accidente cerebrovascular, estreñimiento secundario a una enfermedad renal crónica, estreñimiento secundario a la esclerosis múltiple, estreñimiento secundario a la enfermedad de Parkinson, estreñimiento secundario a

la esclerosis sistémica, estreñimiento inducido por fármacos, síndrome del intestino irritable con estreñimiento (IBS-C), síndrome del intestino irritable mixto (IBS-M), estreñimiento funcional pediátrico y estreñimiento inducido por opiáceos; enfermedad de Crohn; malabsorción primaria de ácidos biliares; síndrome del intestino irritable (IBS); enfermedad inflamatoria intestinal (IBD); inflamación ileal; y enfermedad por reflujo y sus complicaciones, como el esófago de Barrett, la esofagitis por reflujo biliar y la gastritis por reflujo biliar.

6. El compuesto según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno hepático, como un trastorno metabólico hereditario del hígado; errores congénitos de la síntesis de ácidos biliares; anomalías congénitas de las vías biliares; atresia biliar; atresia biliar post-Kasai; atresia biliar posttrasplante de hígado; hepatitis neonatal; colestasis neonatal; formas hereditarias de colestasis; xantomatosis cerebrotendinosa; un defecto secundario de la síntesis de BA; síndrome de Zellweger; enfermedad hepática asociada a la fibrosis quística; deficiencia de alfa1-antitripsina; síndrome de Alagilles (ALGS); síndrome de Byler; un defecto primario de la síntesis de ácidos biliares (BA); colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC), incluidas PFIC-2, PFIC-9, PFIC-1 y PFIC no especificada, PFIC post-desvío biliar y PFIC post-trasplante hepático; colestasis intrahepática recurrente benigna (BRIC), incluidas BRIC2, LCS1 y BRIC no especificada, BRIC post-desvío biliar y BRIC post-trasplante hepático; hepatitis autoinmune; cirrosis biliar primaria (PBC); fibrosis hepática; enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); hipertensión portal; colestasis; colestasis del síndrome de Down; colestasis inducida por fármacos; colestasis intrahepática del embarazo (ictericia durante el embarazo); colestasis intrahepática; colestasis extrahepática; colestasis asociada a nutrición parenteral (PNAC); colestasis asociada a bajo contenido en fosfolípidos; síndrome de colestasis linfedematosa 3 (G4); colangitis esclerosante primaria (PSC); colangitis asociada a inmunoglobulina G4; colangitis biliar primaria; colelitiasis (cálculos biliares); litiasis biliar; coledocolitiasis; pancreatitis por cálculos biliares; enfermedad de Caroli; neoplasia maligna de las vías biliares; neoplasia maligna que causa obstrucción del árbol biliar; estenosis biliar; colangiopatía por AIDS; colangiopatía isquémica; prurito debido a colestasis o ictericia; pancreatitis; enfermedad hepática autoinmune crónica que provoca colestasis progresiva; esteatosis hepática; hepatitis alcohólica; hígado graso agudo; hígado graso del embarazo; Hepatitis inducida por fármacos; trastornos por sobrecarga de hierro; defecto congénito de la síntesis de ácidos biliares tipo 1 (defecto BAS tipo 1); lesión hepática inducida por fármacos (DILI); fibrosis hepática; fibrosis hepática congénita; cirrosis hepática; histiocitosis de células de Langerhans (LCH); colangitis esclerosante por ictiosis neonatal (NISCH); protoporfiria eritropoyética (EPP); ductopenia idiopática del adulto (IAD); hepatitis neonatal idiopática (INH); insuficiencia no sindrómica de los conductos biliares interlobulares (NS PILBD); cirrosis infantil de los indios norteamericanos (NAIC); sarcoidosis hepática; amiloidosis; enterocolitis necrotizante; toxicidades causadas por ácidos biliares séricos, incluidas alteraciones del ritmo cardiaco (por ej. g., fibrilación auricular) en el contexto de un perfil anormal de ácidos biliares séricos, cardiomiopatía asociada a cirrosis hepática ("coleicardia") y atrofia muscular esquelética asociada a hepatopatía colestásica; hepatopatía poliquistica; hepatitis vírica (incluidas hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E); carcinoma hepatocelular (hepatoma); colangiocarcinoma; cánceres gastrointestinales relacionados con los ácidos biliares; y colestasis causada por tumores y neoplasias del hígado, del tracto biliar y del páncreas; o para su uso en la potenciación del tratamiento con corticosteroides en la enfermedad hepática.

7. El compuesto según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o prevención de abetalipoproteinemia, hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL), enfermedad de retención de quilomicrones (CRD); sitosterolemia; hipervitaminosis y osteopetrosis; hipertensión; hiperfiltración glomerular; poliquistosis renal (PKD), incluida la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) y la poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD); y prurito de insuficiencia renal; o para su uso en la protección frente a lesiones renales asociadas a enfermedades hepáticas o metabólicas.