



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112017016766-2 B1**

**(22) Data do Depósito:** 05/02/2016

**(45) Data de Concessão:** 07/11/2023

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UM AGONISTA FXR E FIBRATO, BEM COMO USO PARA TRATAR DOENÇA HEPÁTICA COLESTÁTICA

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/216; A61K 31/575.

**(30) Prioridade Unionista:** 06/02/2015 US 62/113,134.

**(73) Titular(es):** INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** MARK PRUZANSKI; LUCIANO ADORINI.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2016016694 de 05/02/2016

**(87) Publicação PCT:** WO 2016/127019 de 11/08/2016

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 04/08/2017

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA TERAPIA DE COMBINAÇÃO. A presente invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma combinação de um agonista FXR e pelo menos um agente de redução lipídica (por exemplo, agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta, e/ou estatina). Também é divulgado o uso da combinação para o tratamento ou prevenção de uma doença ou afeção mediada por FXR, tal como cirrose biliar primária (PBC), colangite esclerosante primária (PSC), hipertensão portal, diarreia de ácidos biliares, NAFLD (doença hepática gordurosa não alcoólica), NASH (esteato-hepatite não induzida pelo álcool) e outras doenças crônicas do fígado. A combinação da presente invenção é útil para o tratamento ou prevenção de afeções relacionadas com níveis elevados de lipídios e de enzimas hepáticas. A presente invenção se refere também a embalagens ou kits incluindo a combinação farmacêutica.

Relatório descritivo da patente de invenção para  
**"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UM AGONISTA FXR E FIBRATO, BEM COMO USO PARA TRATAR DOENÇA HEPÁTICA COLESTÁTICA".**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] Concentrações elevadas de compostos de lipídios em circulação no sangue, tais como colesterol e triglicerídeos, acompanham uma série de afeções. Estas incluem diabetes de Tipo II, cirrose biliar primária (PBC), colangite esclerosante primária (PSC), vários estados de hepatite crônica (hepatite B e C), NASH (esteato-hepatite não alcoólica), e doenças arteriais, incluindo doença coronariana, doença arterial cerebrovascular, doença arterial periférica, aneurisma da aorta ou aterosclerose da carótida. Várias técnicas de redução lipídica têm sido utilizadas no passado para tratar e prevenir eventos vasculares (tais como insuficiência cardíaca, embolia, ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais) que acompanham os estados de hiperlipidemia. Tais tratamentos incluem mudanças na dieta e controle de níveis elevados de triglicerídeos e de colesterol que circulam no sangue. Os últimos têm sido tratados geralmente a nível farmacológico e ultimamente com várias "estatinas". Agentes terapêuticos usados para o tratamento de afeções de elevados níveis de lipídios incluem vários derivados do ácido fíbrico. Alguns derivados de ácido fíbrico mais antigos incluindo clofibrato foram usados no tratamento de afeções associadas com lipídios elevados, mas, mais recentemente, novos fibratos incluindo fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, e ainda mais recentemente fibratos contendo piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperidin-3- eno e piperazina juntaram-se às fileiras de terapias anti-lipídios. Estas moléculas mais recentes têm propriedades promissoras para reduzir tanto o colesterol como triglicerídeos. No entanto, em algumas situações, um derivado do ácido fíbrico por si só é inadequado

para controlar o nível de hiperlipidemia grave que está presente em muitos pacientes. O perfil de efeitos secundários de um derivado do ácido fíbrico pode também ser melhorado a partir de uma redução da dose, tal como na presença de uma terapia de combinação.

[002] Por conseguinte, existe a necessidade de uma terapia melhorada para o tratamento de afeções envolvendo elevadas concentrações de compostos lipídicos em circulação no sangue, tais como colesterol e triglicerídeos.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[003] A Figura 1A é uma fotomicrografia representativa de uma secção de fígado corado com Sirius-red de camundongos BDL sham.

[004] A Figura 1B é uma fotomicrografia representativa de uma secção de fígado corado com Sirius red de camundongos tratados com veículo BDL.

[005] A Figura 1C é uma fotomicrografia representativa de uma secção de fígado corado com Sirius red de camundongos tratados com BDL-OCA.

[006] A Figura 1D é uma fotomicrografia representativa de uma secção de fígado corado com Sirius red de camundongos tratados com BDL-atorvastatina.

[007] A Figura 1E é uma fotomicrografia representativa de uma secção de fígado corado com Sirius red de camundongos tratados com BDL-OCA-atorvastatina.

[008] A Figura 2 é um gráfico de barras que mostra a área positiva de Sirius red (%) em camundongos BDL tratados com OCA e atorvastatina sozinhos e em combinação.

[009] A Figura 3A é um gráfico de barras mostrando o número de focos de células inflamatórias no tratamento OCA, baixa dose de fenofibrato isoladamente e em combinação em camundongos APOE\*3Leiden.CETP.

[0010] A Figura 3B é um gráfico de barras mostrando o número de focos de células inflamatórias no tratamento OCA, elevada dose de fenofibrato isoladamente e em combinação em camundongos APOE\*3Leiden.CETP.

[0011] A Figura 4 é um gráfico de barras mostrando os efeitos de OCA e atorvastatina sozinhos e em combinação na fase de fibrose em camundongos *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>*.

[0012] A Figura 5A é um gráfico de barras mostrando os níveis de triglicerídeos plasmáticos em camundongos *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* tratados com OCA e atorvastatina sozinhos e em combinação.

[0013] A Figura 5B é um gráfico de barras mostrando a alteração nos níveis de triglicerídeos plasmáticos de referência em camundongos *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* tratados com OCA e atorvastatina sozinhos e em combinação.

[0014] A Figura 6A é um gráfico de barras mostrando uma análise de enriquecimento das vias canônicas de HFC+OCA em relação a camundongos APOE\*3Leiden.CETP sustentados a HFC.

[0015] A Figura 6B é um gráfico de barras mostrando uma análise de enriquecimento das vias canônicas de HFC+OCA + baixa dose de fenofibrato em relação a camundongos APOE\*3Leiden.CETP sustentados a HFC.

[0016] A Figura 7A é um diagrama de Venn mostrando o número de novos genes diferencialmente expressos regulados pela combinação de OCA + dose baixa de fenofibrato em relação a monoterapia em camundongos ApoE\*3Leiden.CETP.

[0017] A Figura 7B é um diagrama de Venn mostrando o enriquecimento de via de genes regulados pela combinação de OCA + dose baixa de fenofibrato em relação a monoterapia em camundongos ApoE\*3Leiden.CETP.

[0018] A Figura 8 é um gráfico que mostra o efeito de OCA e uma



combinação de uma ou mais estatinas sobre o colesterol LDL em humanos.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

[0019] O presente pedido se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta e (iii) opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0020] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um fibrato e, opcionalmente, (iii), um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0021] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um agente de redução lipídica e, opcionalmente, (iii) um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0022] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos uma estatina e, opcionalmente, (iii), um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0023] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta, (iii) pelo menos um agente de redução lipídica, e, opcionalmente, (iv) um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

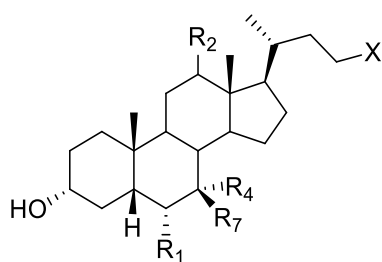
[0024] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um fibrato, (iii) pelo menos um agente de redução lipídica e, opcionalmente, (iv) um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0025] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta, (iii) pelo menos uma estatina, e, opcionalmente, (iv) um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0026] A presente invenção também se relaciona com uma composição farmacêutica compreendendo (i) um primeiro composto, (ii) pelo menos um fibrato, (iii) pelo menos uma estatina e, opcionalmente, (iv) um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0027] A presente invenção também se relaciona com a utilização terapêutica das composições farmacêuticas da presente invenção.

[0028] Em uma modalidade, o primeiro composto é um composto de fórmula A:



(A),

[0029] ou um seu sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido, em que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, e X são como aqui definido.

[0030] A presente invenção também se refere a métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição mediada por FXR ou uma doença ou condição na qual estão envolvidas elevadas

concentrações de compostos lipídicos em circulação no sangue, a redução do nível de uma enzima hepática ou a inibição ou reversão de uma fibrose, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito em necessidade da mesma.

[0031] A presente invenção também se refere ao uso de uma composição farmacêutica da presente invenção para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição mediada por FXR ou uma condição ou condição na qual estão envolvidas elevadas concentrações compostos lipídicos no sangue, a redução do nível de uma enzima hepática ou a inibição ou reversão de uma fibrose.

[0032] A presente invenção também se refere ao uso de uma composição farmacêutica da presente invenção na produção de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição mediada por FXR ou uma doença ou condição na qual estão envolvidas elevadas concentrações de compostos lipídicos em circulação no sangue, a redução do nível de uma enzima hepática ou a inibição ou reversão de uma fibrose.

[0033] As composições e métodos da presente invenção dirigem-se a necessidades não satisfeitas no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio envolvendo concentrações elevadas de compostos lipídicos em circulação no sangue, tais como colesterol e triglicerídeos.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0034] A presente invenção também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR.

[0035] Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo

menos um agonista PPAR-alfa. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista PPAR-delta. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e delta. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e gama. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista PPAR-alfa e pelo menos um agonista PPAR-delta. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista PPAR-alfa e pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e delta. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista PPAR-delta e pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama. Em um exemplo, a composição farmacêutica compreende pelo menos um agonista PPAR-alfa, pelo menos um agonista PPAR-delta e pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e delta. Em um exemplo, o agonista de PPAR-alfa é um fibrato, tal como os fibratos aqui descritos. Em um exemplo, o agonista PPAR-delta é ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil)sulfanil]-2-metilfenoxi}acético, (também conhecido como GW501516, GW1516 e "Endurabol"), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenóxi}-acético ou ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metil fenóxi]-acético, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico (também conhecido como GFT505). Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e gama é aleglitazar (ácido (2S)-2-metoxi-3-[4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)etoxi]-7-benzotiofenil]propanoico), muraglitazar N-[(4-metoxifenoxi)carbonil]-N-{4-[2-(5-metil-2-fenil-1,3-oxazol-4-il)etoxi]benzil}glicina, tesaglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico) ou saroglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-(2-{2-metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol-1-il}etoxi)fenil]propanoico), ou um

seu sal farmaceuticamente aceitável. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6- dimetil-4- [3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

[0036] O presente pedido também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos um fibrato e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR. O agonista FXR pode ser qualquer agonista FXR. O fibrato pode ser qualquer fibrato. Em um exemplo, o fibrato é selecionado de quaisquer fibratos aqui descritos.

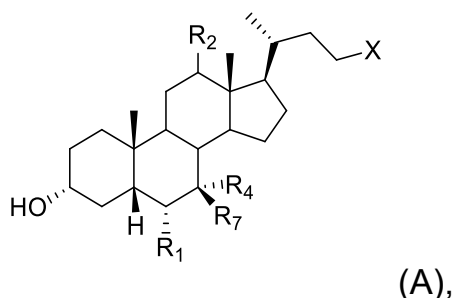
[0037] O presente pedido também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos um agente de redução lipídica e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR. O agonista FXR pode ser qualquer agonista FXR. O agente de redução lipídica pode ser qualquer agente de redução lipídica. Em um exemplo, o agente de redução lipídica é selecionado de qualquer agente de redução lipídica descrito neste documento.

[0038] O presente pedido também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos uma estatina e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR. O agonista FXR pode ser qualquer agonista FXR. A estatina pode ser qualquer estatina. Em um exemplo, a estatina é selecionada de quaisquer estatinas aqui descritas.

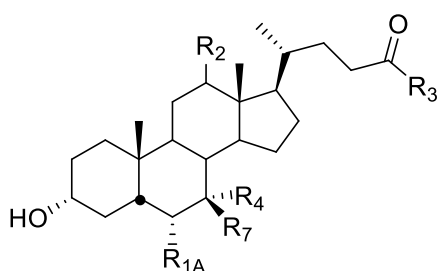
[0039] O presente pedido também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, pelo menos um agente de redução lipídica e,

opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR. O presente pedido também se dirige a uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro composto, pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, pelo menos uma estatina e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, em que o primeiro composto é um agonista FXR. Em um exemplo, o agonista de PPAR-alfa é um fibrato, tal como os fibratos aqui descritos. Em um exemplo, o agonista PPAR-delta é ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil)sulfanil]-2-metilfenoxi}acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenóxi}-acético ou ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metil fenóxi]-acético, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6- dimetil-4- [3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e gama é aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar ou saroglitazar ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6- dimetil-4- [3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. Em um exemplo, o agente de redução lipídica é selecionado de qualquer agente de redução lipídica descrito neste documento. Em um exemplo, a estatina é selecionada de quaisquer estatinas aqui descritas.

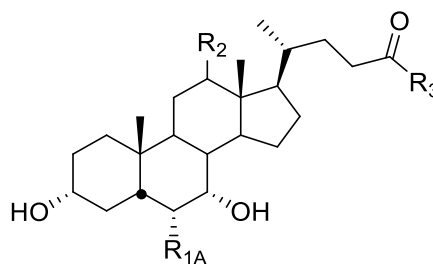
[0040] Em um exemplo, o primeiro composto da composição farmacêutica é um composto de fórmula A:







(II) e



(IIA)

[0057] ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, ou seu conjugado de aminoácido, em que:

[0058]  $R_{1A}$  é hidrogênio ou  $C_1$ - $C_6$  alquila não substituída;

[0059]  $R_2$  é hidrogênio ou  $\alpha$ -hidroxila;

[0060]  $R_3$  é hidroxila,  $NH(CH_2)_mSO_3H$ , ou  $NH(CH_2)_nCO_2H$ ;

[0061]  $R_4$  é hidroxila ou hidrogênio;

[0062]  $R_7$  é hidroxila ou hidrogênio;

[0063]  $m$  é 1, 2 ou 3; e

[0064]  $n$  é 1, 2 ou 3.

[0065] Em um exemplo, a composição inclui um primeiro composto da fórmula A, I, IA, II ou IIA, em que  $R_2$  é hidrogênio.

[0066] Ainda em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que  $R_1$  é  $C_1$ - $C_6$  alquila não substituída. Em outro aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que  $R_1$  é  $C_1$ - $C_3$  alquila não substituída. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que  $R_1$  é selecionado de metila, etila e propila. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que  $R_1$  é etila.

[0067] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula I, IA, II ou IIA, em que  $R_{1A}$  é  $C_1$ - $C_6$  alquila não substituída. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula I, IA, II ou IIA, em que  $R_{1A}$  é  $C_1$ - $C_3$  alquila não substituída. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula I, IA, II ou IIA, em que  $R_{1A}$  é selecionado de metila, etila e propila. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula I, IA,



II ou IIA, em que  $R_{1A}$  é etila.

[0068] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto da fórmula A, em que X é selecionado então de  $C(O)OH$ ,  $C(O)NH(CH_2)_mSO_3H$  e  $C(O)NH(CH_2)_nCO_2H$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que X é selecionado de  $C(O)OH$ ,  $C(O)NH(CH_2)SO_3H$ ,  $C(O)NH(CH_2)CO_2H$ ,  $C(O)NH(CH_2)_2SO_3H$ ,  $C(O)NH(CH_2)_2CO_2H$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que X é  $C(O)OH$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que X é  $OSO_3H$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que o primeiro composto é um sal farmaceuticamente aceitável. O sal farmaceuticamente aceitável pode ser qualquer sal. Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que X é  $OSO_3^-Na^+$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que X é  $OSO_3^-NHEt_3^+$ . Em um aspecto, o conjugado de aminoácido é um conjugado de glicina. Em um aspecto, o conjugado de aminoácido é um conjugado de taurina.

[0069] Ainda em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula II ou IIA, em que  $R_3$  é selecionado de  $OH$ ,  $NH(CH_2)SO_3H$ ,  $NH(CH_2)CO_2H$ ,  $NH(CH_2)_2SO_3H$  e  $NH(CH_2)_2CO_2H$ . Em um aspecto, a composição inclui um primeiro composto de fórmula II ou IIA, em que  $R_3$  é  $OH$ .

[0070] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, I ou II, em que  $R_4$  é hidroxila e  $R_7$  é hidrogênio.

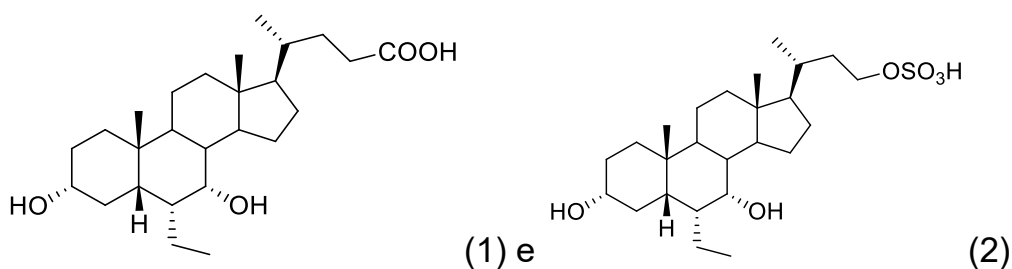
[0071] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula A, em que  $R_1$  é selecionado de metila, etila e propila,  $R_4$  é  $OH$ ,  $R_7$  é  $H$  e  $R_2$  é  $H$ .

[0072] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula I ou II, em que  $R_{1A}$  é selecionado de metila, etila e

propila,  $R_4$  é OH,  $R_7$  é H e  $R_2$  é H.

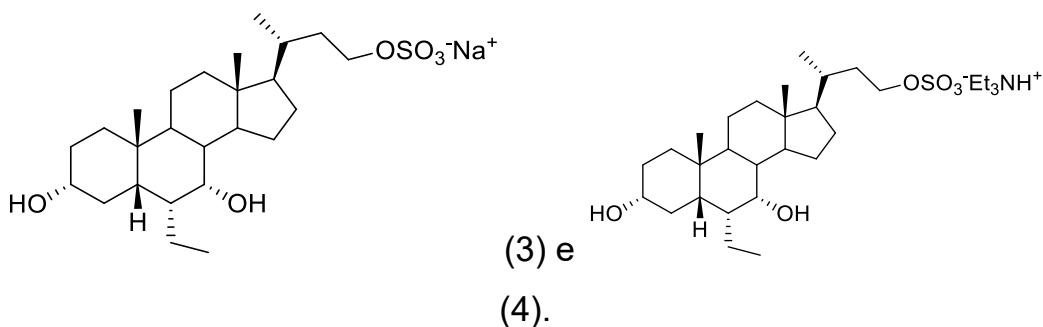
[0073] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto de fórmula IA ou IIA, em que  $R_{1A}$  é selecionado de metila, etila e propila e  $R_2$  é H.

[0074] Em outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto selecionado a partir de



[0075] ou um seu sal farmacêuticamente aceitável ou seu conjugado de aminoácido.

[0076] Em ainda outro exemplo, a composição inclui um primeiro composto que é um sal farmacêuticamente aceitável selecionado a partir de



[0077] Compostos de fórmulas I, IA, II e IIA são subconjuntos de compostos de fórmula A. As características descritas neste documento para os compostos de fórmula A aplicam-se igualmente aos compostos de fórmulas I, IA, II e IIA. O presente pedido também descreve as composições farmacêuticas, embalagens ou kits e usos terapêuticos da combinação.

[0078] Um dos problemas a serem resolvidos pela presente invenção é a identificação de terapias de combinação para o tratamento ou prevenção de afeções relacionadas com elevadas concentrações de

compostos lipídicos em circulação no sangue, como colesterol e triglicerídeos, por exemplo, uma condição hepática colestática como PBC, bem como para a redução de compostos lipídicos (por exemplo, colesterol, LDL e triglicerídeos) em circulação no sangue e para a redução da bilirrubina e/ou enzimas hepáticas, tais como a fosfatase alcalina (ALP, AP ou Alk Phos), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), lactato desidrogenase (LDH) e 5' nucleotidase. Apesar de existirem fármacos para as afeções relacionadas com níveis elevados de lipídios e/ou níveis elevados de enzimas hepáticas, estes fármacos muitas vezes não são adequados para muitos pacientes por uma variedade de razões. Por exemplo, certos fármacos são ineficazes para pacientes que desenvolveram resistência a fármacos como, por exemplo, ácido ursodesoxicólico. Como outro exemplo, muitos fármacos de estatinas têm efeitos adversos, tais como problemas musculares, perda cognitiva, neuropatia, disfunção pancreática e hepática e disfunção sexual. Alguns fármacos podem ser inadequados para o tratamento quando administrados isoladamente. Por exemplo, em algumas situações, um agente de redução lipídica por si só é inadequado para controlar o nível de hiperlipidemia grave que está presente em muitos pacientes. Alguns fármacos podem exigir a administração de doses elevadas, ou administração mais frequente, devido a metabolismo extenso em metabólitos inativos ou menos potentes. As terapias de combinação aqui descritas podem resolver os problemas mencionados acima e podem ter uma ou mais vantagens, por exemplo, sinergismo, reduzindo o número de doses diárias sem perda de eficácia do fármaco, reduzindo lipídios (tanto colesterol como triglicerídeos) em pacientes cujos níveis elevados de lipídios são resistentes à terapia em PBC, maior potência, seletividade, penetração de tecido, meia-vida e/ou estabilidade metabólica.

[0079] Nas composições, embalagens ou kits, métodos e usos da presente invenção, o primeiro composto pode ser o ácido livre ou pode ser um sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido (por exemplo, glicina ou conjugado de taurina). Em um aspecto, o primeiro composto é qualquer agonista FXR. Em um aspecto, o primeiro composto é um composto de fórmula A. Em um aspecto, o primeiro composto é um composto de fórmula I ou IA. Em um aspecto, o primeiro composto é um composto de fórmula IA. Em um aspecto, o primeiro composto é um composto de fórmula II ou IIA. Em um aspecto, o primeiro composto é um composto de fórmula IIA. Em um aspecto, o primeiro composto é ácido obeticólico (Composto 1). Em um aspecto, o primeiro composto é o Composto 2. Em um aspecto, o primeiro composto é o sal farmaceuticamente aceitável do Composto 3. Em um aspecto, o primeiro composto é o sal farmaceuticamente aceitável do Composto 4.

[0080] Nas composições, pacotes ou kits, métodos e usos da presente invenção, o fibrato pode ser qualquer fibrato. Em um aspecto, o fibrato é selecionado do grupo constituído por fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, etofibrato, gemfibrozil, nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, sinfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrida e um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável, e derivados do ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico, em que a fração fenóxi é substituída com um resíduo opcionalmente substituído de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno ou piperazina, conforme divulgado na Publicação de Pedido de Patente Europeu nº EP0607536. Em um aspecto, o fibrato é selecionado do grupo constituído por bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozil, binifibrato, clinofibrato, ácido clofíbrico, nicofibrato, pirifibrato, plafibrida, ronifibrato, teofibrato, tocofibrato e um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável, e derivados do ácido 2-

fenoxi-2-metilpropanoico, em que a fração fenóxi é substituída com um resíduo opcionalmente substituído de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno ou piperazina, conforme divulgado na Publicação de Pedido de Patente Europeu nº EP0607536. Um exemplo do último grupo de substâncias é o ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil)piperidin-4-il]fenoxi-2-metil-propanoico. Por exemplo, o fibrato é bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, ou um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável. Por exemplo, o fibrato é fenofibrato ou um sal farmacologicamente aceitável selecionado a partir de colina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, cálcio e trometamina. Por exemplo, o fibrato é clofibrato ou um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável, como etofibrato ou clofibrato de alumínio. Por exemplo, o fibrato é bezafibrato. Por exemplo, o fibrato é um derivado do ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico, tal como ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil)-piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

[0081] Em uma modalidade, o primeiro composto é o ácido livre de um composto de fórmula A, e o pelo menos um fibrato é selecionado de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável.

[0082] Em uma modalidade, o primeiro composto é um sal farmacologicamente aceitável do composto de fórmula A, e o pelo menos um fibrato é selecionado de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável.

[0083] Em uma modalidade, o primeiro composto é o conjugado de glicina de um composto de fórmula A, e o pelo menos um fibrato é selecionado de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e um seu sal ou éster farmacologicamente aceitável.

[0084] Em uma modalidade, o primeiro composto é o conjugado de taurina de um composto de fórmula A, e o pelo menos um fibrato é

selecionado de bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e seus sais ou ésteres farmacologicamente aceitáveis.

[0085] Em uma modalidade, o primeiro composto é um composto de fórmula A ou um sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido, e o pelo menos um fibrato é ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzil)-piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

[0086] Em uma modalidade, o primeiro composto é um composto de fórmula A ou um sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido, e o pelo menos um agonista PPAR-delta é ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil]sulfanil]-2-metilfenoxi}acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenóxi}-acético ou ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metil fenóxi]-acético, ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

[0087] Em uma modalidade, o primeiro composto é um composto de fórmula A ou um sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido, e o pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico. Em uma modalidade, o primeiro composto é um composto de fórmula A ou um sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido, e o pelo menos um agonista dual PPAR-alfa e gama é aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar, ou saroglitazar ou um seu sal farmacologicamente aceitável. Em um exemplo, o agonista dual PPAR-alfa e delta é ácido 2-[2,6- dimetil-4- [3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico, ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

[0088] Nas composições, embalagens ou kits, métodos e usos da presente invenção, a estatina pode ser qualquer estatina. Em um aspecto, a estatina é selecionada de entre sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina,

lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina.

[0089] Em uma modalidade, o primeiro composto é o ácido livre de um composto de fórmula A, e a pelo menos uma estatina é selecionada de entre sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina.

[0090] Em uma modalidade, o primeiro composto é um sal farmaceuticamente aceitável do composto de fórmula A, e a pelo menos uma estatina é selecionada de entre sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina.

[0091] Em uma modalidade, o primeiro composto é o conjugado de glicina de um composto de fórmula A, e a pelo menos uma estatina é selecionada de entre sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina.

[0092] Em uma modalidade, o primeiro composto é o conjugado de taurina de um composto de fórmula A, e a pelo menos uma estatina é selecionada de entre sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina.

[0093] A invenção também compreende um primeiro composto isotopicamente marcado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, que tem uma estrutura idêntica à do primeiro composto da presente invenção (por exemplo, um composto de fórmula

A, I, IA, II ou IIA), exceto pelo fato de um ou mais átomos serem substituídos por um átomo tendo uma massa atômica ou o número de massa diferente da massa atômica ou número de massa mais comumente encontrado na natureza. Exemplos de isótopos que podem ser incorporados no primeiro composto ou seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, incluem isótopos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, flúor, tais como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$  e  $^{18}\text{F}$ .

[0094] O primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido que contém os isótopos acima mencionados e/ou outros isótopos de outros átomos encontra-se no escopo da presente invenção. O primeiro composto isotopicamente marcado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, por exemplo, um primeiro composto no qual isótopos radioativos como  $^3\text{H}$  e/ou  $^{14}\text{C}$  são incorporados, é útil em estudos de distribuição tecidual dos fármacos e/ou substratos. Isótopos tritiados, ou seja,  $^3\text{H}$  e carbono-14, ou seja,  $^{14}\text{C}$ , são usados pela sua facilidade de preparação e capacidade de detecção. Além disso, a substituição com isótopos mais pesados tais como deutério, ou seja,  $^2\text{H}$ , pode providenciar certas vantagens terapêuticas resultantes de maior estabilidade metabólica, por exemplo, aumento da meia-vida *in vivo* ou uma redução dos requisitos de dosagem e, assim, pode ser utilizada em algumas circunstâncias. O primeiro composto isotopicamente marcado ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido podem ser preparados realizando os procedimentos revelados nos Esquemas e/ou nos Exemplos da invenção, substituindo um reagente isotopicamente marcado prontamente disponível por um reagente não marcado isotopicamente. Em uma modalidade, o ácido obeticólico, ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis ou conjugados de aminoácidos, não são marcados isotopicamente.

[0095] A presente invenção também fornece um método para tratar



ou prevenir uma doença ou condição, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito com necessidade da mesma.

[0096] Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença ou condição mediada por FXR. Exemplos de doenças ou afeções mediadas por FXR incluem, mas não se limitam a, doenças hepáticas (incluindo doenças hepáticas colestáticas e não colestáticas), tais como cirrose biliar primária (PBC), colangite esclerosante primária (PSC), atresia biliar, hipertensão portal, diarreia de ácidos biliares, doença hepática crônica, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não-alcoólica (NASH), infecção pela hepatite C, doença hepática alcoólica, danos no fígado devido a fibrose progressiva e fibrose hepática. Exemplos de doenças mediadas por FXR incluem também hiperlipidemia, colesterol LDL elevado, colesterol HDL elevado, triglicerídeos elevados e doença cardiovascular.

[0097] NAFLD é uma condição médica que se caracteriza pelo acúmulo de gordura (chamada infiltração adiposa) no fígado. NAFLD é uma das causas mais comuns de doença hepática crônica e abrange um espectro de condição associadas à deposição de lipídios em hepatócitos. Varia de esteatose (fígado gordo simples), a esteato-hepatite não-alcoólica (NASH), até fibrose e cirrose avançados. A doença a maior parte das vezes é silenciosa e muitas vezes é descoberta através de níveis acidentalmente elevados de enzimas hepáticas. NAFLD está fortemente associada a obesidade e resistência à insulina e atualmente é considerada por muitos como o componente hepático da síndrome metabólica.

[0098] A esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) é uma condição que causa inflamação e acúmulo de gordura e tecido fibroso (cicatricial) no fígado. Os níveis de enzimas hepáticas no sangue podem ser mais elevados do que as elevações ligeiras observadas com fígado

gorduroso não alcoólico (NAFL). Apesar de condição semelhantes poderem ocorrer em pessoas que abusam do álcool, NASH ocorre em pessoas que bebem pouco ou nenhum álcool. NASH afeta entre 2 a 5 por cento dos americanos, e é mais frequentemente observada em pessoas com uma ou mais das seguintes afeções: obesidade, diabetes, hiperlipidemia, resistência à insulina, usos de certos medicamentos e exposição a toxinas. NASH é uma causa cada vez mais comum de doença hepática crônica no mundo inteiro e está associada ao aumento da mortalidade relacionada com o fígado e carcinoma hepatocelular, mesmo na ausência de cirrose. NASH progride para cirrose em 15 a 20% dos indivíduos afetados e é agora uma das indicações principais para transplante de fígado nos Estados Unidos. Atualmente não existem terapias aprovadas para NASH.

[0099] Em uma modalidade, a doença ou condição é hiperlipidemia. Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença hepática colestática. Em uma modalidade, a doença ou condição é PBC. Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença cardiovascular. Em outra modalidade, a doença cardiovascular é a aterosclerose, hipercolesterolemia ou hipertrigliceridemia.

[00100] A presente invenção também fornece um método para tratar ou prevenir NAFLD ou NASH. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir NAFLD ou NASH associado a hiperlipidemia. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir NASH. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir NASH associado a hiperlipidemia.

[00101] A presente invenção também fornece um método para inibir ou reverter fibrose, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito com necessidade da mesma. Em uma

modalidade, o sujeito não está sofrendo de uma condição colestática. Em uma modalidade, o sujeito sofre de uma condição colestática.

[00102] Numa modalidade, o sujeito não está a sofrer de uma condição colestática associada a uma doença ou condição selecionada a partir do grupo que consiste de câncer primário de fígado e das vias biliares (incluindo carcinoma hepatocelular), câncer colo-rectal, câncer metastático, sepse, nutrição parenteral total crônica, fibrose cística e doença hepática granulomatosa. Em modalidades, a fibrose a ser inibida ou revertida ocorre em um órgão onde é expresso FXR.

[00103] Em uma modalidade, uma condição colestática é definida como tendo um nível sérico anormalmente elevado de fosfatase alcalina,  $\gamma$ -glutamiltansaminotransferase (GGT) e/ou 5' nucleotidase. Em outra modalidade, uma condição colestática é ainda definida como apresentando pelo menos um sintoma clínico. Em uma modalidade, o sintoma é comichão (prurido). Em outra modalidade, uma condição colestática é selecionada a partir do grupo consistindo de cirrose biliar primária (CBP), colangite esclerosante primária (PBS), colestase induzida por drogas, colestase hereditária, atresia biliar e colestase intra-hepática de gravidez.

[00104] Em uma modalidade, a fibrose é selecionada a partir do grupo consistindo de fibrose hepática, fibrose renal e fibrose intestinal.

[00105] Em uma modalidade, o sujeito tem fibrose hepática associada a uma doença selecionada a partir do grupo consistindo de hepatite B; hepatite C; doenças hepáticas parasitárias; infecções bacterianas, virais e fúngicas pós-transplante; doença hepática alcoólica (ALD); doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD); esteato-hepatite não alcoólica (NASH); doenças hepáticas induzidas por metotrexato, isoniazida, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida ou amiodarona; hepatite auto-imune; sarcoidose; doença de Wilson; hemocromatose; doença de Gaucher; doenças de

armazenamento de glicogênio tipos III, IV, VI, IX e X; deficiência de antitripsina  $\alpha_1$ ; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; perturbação vascular associada com a síndrome de Budd-Chiari, doença veno-oclusiva, ou trombose da veia porta; e fibrose hepática congênita.

[00106] Em outra modalidade, o sujeito tem fibrose intestinal associada a uma doença selecionada a partir do grupo consistindo de doença de Crohn, colite ulcerosa, colite pós-radiação e colite microscópica.

[00107] Em outra modalidade, o sujeito tem fibrose renal associada a uma doença selecionada a partir do grupo que consiste de nefropatia diabética, nefrosclerose hipertensiva, glomerulonefrite crônica, glomerulopatia do transplante crônica, nefrite intersticial crônica e doença renal policística.

[00108] A presente invenção também fornece um método para o tratamento ou prevenção de todas as formas de afeções relacionadas com níveis lipídicos elevados. Em uma modalidade, a condição é a hiperlipidemia associada a uma condição selecionada a partir de cirrose biliar primária resistente; cirrose biliar primária onde há testes de função hepática elevados e hiperlipidemia associados, colangite esclerosante primária, esteato-hepatite não induzida por álcool; e doença hepática crônica associada a hepatite B, C ou álcool. Em outra modalidade, a presente invenção proporciona um método para o tratamento ou a prevenção de hiperlipidemia, em que a hiperlipidemia é hiperlipidemia primária, com ou sem uma componente genética, ou hiperlipidemia associada a doença arterial coronariana, doença arterial cerebrovascular, doença vascular periférica, aneurismas da aorta ou aterosclerose carótida.

[00109] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir colangite esclerosante primária para

anormalidades bioquímicas semelhantes, assim como hepatite crônica provocada pelo vírus da hepatite B, C ou por álcool. Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir outros distúrbios arteriais associados a hiperlipidemia. Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir hipertrigliceridemia.

[00110] A presente invenção também fornece um método para reduzir níveis lipídicos (ou seja, a quantidade de lipídios), tais como no sangue, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito com necessidade da mesma. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis lipídicos em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem níveis elevados de lipídios quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método do presente pedido de patente reduz os níveis lipídicos para níveis normais (por exemplo, semelhantes aos níveis lipídicos em um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas).

[00111] Em uma modalidade, o lipídio é colesterol. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de colesterol em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem níveis elevados de colesterol quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de colesterol para níveis

inferiores a 400 mg/L, 350 mg/L, 300 mg/L, 250 mg/L, 240 mg/L, 230 mg/L, 220 mg/L, 210 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L ou 150 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de colesterol para níveis inferiores a 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L ou 150 mg/L.

[00112] Em uma modalidade, o colesterol é LDL. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem níveis elevados de LDL quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL para níveis inferiores a 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L ou 50 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL para níveis inferiores a 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L ou 50 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL para níveis inferiores a 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L ou 50 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL para níveis inferiores a 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L ou 50 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de LDL para níveis inferiores a 70 mg/L, 60 mg/L ou 50 mg/L.

[00113] Em uma modalidade, o lipídio é um triglicerídeo. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de triglicerídeos em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80% ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem níveis elevados de triglicerídeos quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de triglicerídeos para níveis inferiores a 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L ou 100 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de triglicerídeos para níveis inferiores a 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L ou 100 mg/L. Em uma modalidade, o método da presente invenção reduz os níveis de triglicerídeos para níveis inferiores a 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L ou 100 mg/L.

[00114] A presente invenção também fornece um método para reduzir a quantidade de bilirrubina e/ou uma ou mais enzimas hepáticas, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito com necessidade da mesma.

[00115] Em uma modalidade, o método do presente pedido de patente reduz a quantidade de bilirrubina em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem um nível elevado de bilirrubina quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de bilirrubina para um nível normal (por exemplo, semelhante ao nível de bilirrubina em um indivíduo sem uma

doença ou condição como as aqui descritas). Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de bilirrubina para níveis inferiores a 10 mg/L, 9 mg/L, 8 mg/L, 7 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,2 mg/L ou 1 mg/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de bilirrubina para níveis inferiores a 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,2 mg/L ou 1 mg/L.

[00116] Em uma modalidade, a enzima hepática é selecionada a partir do grupo que consiste de fosfatase alcalina (ALP, AP, ou Alk Phos), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamyl-transpeptidase (GGT), lactato desidrogenase (LDH ) e 5' nucleotidase. Em uma modalidade, o método do presente pedido de patente reduz a quantidade de uma ou mais enzimas hepáticas em, pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, em comparação com um sujeito de controle (por exemplo, um sujeito não administrado com a composição da presente invenção). Em uma modalidade, o sujeito tem níveis elevados de uma ou mais enzimas hepáticas quando comparado com um sujeito saudável (por exemplo, um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas). Em uma modalidade, o método do presente pedido de patente reduz os níveis de uma ou mais enzimas hepáticas (por exemplo, ALP, ALT, AST, GGT, LDH e 5' nucleotidase) para níveis normais (por exemplo, semelhantes a níveis de enzimas hepáticas em um indivíduo sem uma doença ou condição como as aqui descritas).

[00117] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de ALP para níveis inferiores a 500 IU/L (unidades internacionais por litro), 400 IU/L, 300 IU/L, 200 IU/L, 180 IU/L, 160 IU/L ou 150 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de ALP para cerca de 40 IU/L a cerca de 150 IU/L.



[00118] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de ALT para níveis inferiores a 200 IU/L (unidades internacionais por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 80 IU/L, 60 IU/L ou 50 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de ALT para cerca de 5 IU/L a cerca de 50 IU/L.

[00119] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de AST para níveis inferiores a 200 IU/L (unidades internacionais por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 80 IU/L, 60 IU/L, 50 IU/L ou 40 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de AST para cerca de 10 IU/L a cerca de 50 IU/L.

[00120] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de GGT para níveis inferiores a 200 IU/L (unidades internacionais por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 90 IU/L, 80 IU/L, 70 IU/L ou 60 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de GGT para cerca de 15 IU/L a cerca de 50 IU/L ou para cerca de 5 IU/L a cerca de 30 IU/L.

[00121] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de LDH para níveis inferiores a 500 IU/L (unidades internacionais por litro), 400 IU/L, 300 IU/L, 200 IU/L, 180 IU/L, 160 IU/L, 150 IU/L, 140 IU/L ou 130 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de LDH para cerca de 120 IU/L a cerca de 220 IU/L.

[00122] Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de 5' nucleotidase para níveis inferiores a 50 IU/L (unidades internacionais por litro), 40 IU/L, 30 IU/L, 20 IU/L, 18 IU/L, 17 IU/L, 16 IU/L, 15 IU/L, 14 IU/L, 13 IU/L, 12 IU/L, 11 IU/L, 10 IU/L, 9 IU/L, 8 IU/L, 7 IU/L, 6 IU/L ou 5 IU/L. Em uma outra modalidade, o método do presente pedido de patente reduz o nível de 5' nucleotidase para cerca de 2 IU/L a cerca de 15 IU/L.

[00123] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção

compreendem administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto que é um agonista FXR, em combinação com pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta e, opcionalmente, um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Em uma outra modalidade, o método compreende administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto, em combinação com pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta, em que o primeiro composto é um composto aqui descrito (por exemplo, um composto de fórmula A, I, IA, II ou IIA, ou Composto 1 2, 3 ou 4) ou um seu sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido.

[00124] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto que é um agonista FXR, em combinação com pelo menos um fibrato, e opcionalmente um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Em uma outra modalidade, o método compreende administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto, em combinação com pelo menos um fibrato, em que o primeiro composto é um composto aqui descrito (por exemplo, um composto de fórmula A, I, IA, II ou IIA, ou Composto 1 2, 3 ou 4) ou um seu sal farmacologicamente aceitável ou conjugado de aminoácido.

[00125] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto que é um agonista FXR, em combinação com pelo menos uma estatina, e opcionalmente um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Em uma outra modalidade, o método compreende administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto, em

combinação com pelo menos uma estatina, em que o primeiro composto é um composto aqui descrito (por exemplo, um composto de fórmula A, I, IA, II ou IIA, ou Composto 1 2, 3 ou 4) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido.

[00126] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto que é um agonista FXR, em combinação com pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta, pelo menos uma estatina e, opcionalmente, um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em uma outra modalidade, o método compreende administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto, em combinação com pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, e/ou agonista dual PPAR-alfa e delta, pelo menos uma estatina, em que o primeiro composto é um composto aqui descrito (por exemplo, um composto de fórmula A, I, IA, II ou IIA, ou Composto 1 2, 3 ou 4) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido.

[00127] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto que é um agonista FXR, em combinação com pelo menos um fibrato, pelo menos uma estatina, e opcionalmente um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em uma outra modalidade, o método compreende administrar a um sujeito necessitado uma quantidade eficaz de um primeiro composto, em combinação com pelo menos um fibrato, pelo menos uma estatina, em que o primeiro composto é um composto aqui descrito (por exemplo, um composto de fórmula A, I, IA, II ou IIA, ou Composto 1, 2, 3 ou 4) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido.

[00128] Em uma modalidade, o sujeito é um mamífero. Em uma modalidade, o mamífero é um humano.

[00129] Em uma modalidade, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, fibrato(s) ou estatina(s) são administrados em uma combinação de duas vias, ou seja, sem qualquer agente terapêutico que não seja o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, fibrato(s) ou estatina(s). Em uma modalidade adicional, o primeiro composto e fibrato(s) são administrados em uma combinação de duas vias, ou seja, sem qualquer agente terapêutico que não seja o primeiro composto e fibrato(s). Em outra modalidade, o primeiro composto e estatina(s) são administrados em uma combinação de duas vias, ou seja, sem qualquer agente terapêutico que não seja o primeiro composto e estatina(s).

[00130] Em outra modalidade, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados em uma combinação de três vias com uma estatina. Em uma modalidade adicional, o primeiro composto e fibrato(s) são administrados em uma combinação de três vias com uma estatina.

[00131] O primeiro composto, juntamente com agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s), e/ou estatina(s) pode atingir profundos efeitos sinérgicos, tais como reduções sinérgicas em estados hiperlipidêmicos combinados graves e aqueles resistentes a terapias individuais e dos níveis de uma ou mais enzimas hepáticas. Portanto, para as hiperlipidemias muito difíceis de controlar, é vantajosa uma combinação do primeiro composto, um agonista PPAR-alfa, um agonista PPAR-delta, um agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou um fibrato, e/ou uma estatina. Pode ser particularmente vantajoso que tal combinação do primeiro composto, um fibrato, e/ou

uma estatina seja fornecida em uma única composição farmacêutica com um transportador farmaceuticamente aceitável (tal como em forma de cápsula única) projetada para aumentar a conformidade e, portanto, a eficácia. Nesse sentido, a invenção fornece adicionalmente uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz do primeiro composto, uma quantidade eficaz de pelo menos um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, ou agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, e uma quantidade eficaz de pelo menos uma estatina, em conjunto com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, diluentes, adjuvantes ou excipientes. Em uma modalidade, a invenção fornece adicionalmente uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz do primeiro composto, uma quantidade eficaz de pelo menos um fibrato, e uma quantidade eficaz de pelo menos uma estatina, em conjunto com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, diluentes, adjuvantes ou excipientes.

[00132] Em uma modalidade, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados simultaneamente. Por exemplo, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados em conjunto em uma composição farmacêutica única com um transportador farmaceuticamente aceitável. Em outra modalidade, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados sequencialmente. Por exemplo, o primeiro composto é administrado antes ou subsequentemente aos agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s).

[00133] Em uma modalidade, o primeiro composto e a estatina são administrados simultaneamente. Por exemplo, o primeiro composto e a

estatina são administrados em conjunto em uma composição farmacêutica única com um transportador farmaceuticamente aceitável. Em outra modalidade, o primeiro composto e a estatina são administrados sequencialmente. Por exemplo, o primeiro composto é administrado antes ou subsequentemente à estatina.

[00134] Em uma modalidade, o primeiro composto é administrado em uma primeira dose, durante um primeiro período de tempo, seguido da administração do primeiro composto em uma segunda dose durante um segundo período de tempo. Em uma modalidade, um primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido é administrado em uma quantidade diária total de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg ou 5-25 mg durante um primeiro período de tempo, seguido da administração do primeiro composto em uma quantidade diária total de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg ou 5-25 mg. Em uma modalidade, a quantidade total é administrada oralmente uma vez por dia. Em uma modalidade, a primeira dose é diferente da segunda dose. Em uma modalidade adicional, a primeira dose é inferior à segunda dose. Em outra modalidade, a primeira dose é superior à segunda dose. Em uma modalidade, a primeira dose é de cerca de 5 mg (por exemplo, de 4,8 mg a 5,2 mg), e a segunda dose é cerca de 10 mg (por exemplo, de 9,8 mg a 10,2 mg). Em uma modalidade, o primeiro período de tempo é de cerca de 6 meses. Em uma modalidade, o segundo período de tempo é de cerca de 6 meses.

[00135] Em uma modalidade, a composição farmacêutica é administrada por via oral, parentérica ou topicamente. Em outra modalidade, a composição farmacêutica é administrada por via oral.

[00136] Uma composição em conformidade com a presente invenção irá conter tipicamente primeiro composto suficiente ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato(s) e/ou estatina(s) para permitir que a desejada dose diária de cada um seja administrada a um sujeito necessitado em forma de dosagem unitária única, tal como um comprimido ou cápsula, ou em duas ou mais formas de dosagem unitária para serem administradas simultaneamente ou em intervalos durante um dia.

[00137] A invenção também fornece uma composição farmacêutica em que o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados em combinação com UDCA. Em um aspecto, UDCA é administrado em uma combinação de três vias. Em outro aspecto, a combinação de duas vias de um primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) é administrada para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, em vez de UDCA a um sujeito que tem uma resposta terapêutica inadequada a UDCA isoladamente.

[00138] Nos métodos da presente invenção, as substâncias ativas podem ser administradas em doses diárias únicas ou em duas, três, quatro ou mais doses idênticas ou diferentes por dia, e podem ser administradas simultaneamente ou em momentos diferentes durante o dia. Geralmente, as substâncias ativas serão administradas simultaneamente, mais geralmente em uma forma de dosagem combinada única.

[00139] Em um aspecto, o primeiro composto e agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrados em dosagens

substancialmente iguais às dosagens a que são administrados nas respectivas monoterapias. Em um aspecto, o primeiro composto é administrado em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) à sua dosagem em monoterapia. Em um aspecto, o(s) agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) é/são administrado(s) em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) à sua dosagem em monoterapia. Em um aspecto, tanto o primeiro composto como o(s) agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) são administrado(s) em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) às respectivas dosagens em monoterapia. Em um aspecto, a ou as estatinas são administradas em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) à sua dosagem em monoterapia. Em um aspecto, tanto o primeiro composto como a ou as estatinas são administrados em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) às respectivas dosagens em monoterapia. Em um aspecto, o primeiro composto, o(s) agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) e/ou estatina(s) são administrado(s) em uma dosagem que é inferior (por exemplo, menos de 90%, menos de 80%, menos de 70%, 60%, menos de 50%, menos



de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10%) às respectivas dosagens em monoterapia.

[00140] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode se apresentar em qualquer forma conveniente para a administração oral, tal como um comprimido, cápsula, pó, pastilha, pílula, comprimido mastigável, elixir, pó liofilizado, solução, grânulo, suspensão, emulsão, xarope ou tintura. Podem também ser preparadas formas de liberação lenta, liberação modificada ou liberação retardada, por exemplo sob a forma de partículas revestidas, comprimidos multi-camada, cápsulas dentro de cápsulas, comprimidos dentro de cápsulas ou microgrânulos.

[00141] Formas sólidas para administração oral podem conter ligantes farmacêuticamente aceitáveis, adoçantes, agentes de desintegração, diluentes, agentes aromatizantes, agentes de revestimento, conservantes, lubrificantes e/ou agentes retardantes. Ligantes apropriados incluem goma acácia, gelatina, amido de milho, goma tragacanto, alginato de sódio, carboximetilcelulose ou polietileno glicol. Adoçantes apropriados incluem sacarose, lactose, glucose, aspartame ou sacarina. Agentes de desintegração adequados incluem amido de milho, metilcelulose, polivinilpirrolidona, goma xantana, bentonita, ácido algínico ou ágar. Diluentes apropriados incluem lactose, sorbitol, manitol, dextrose, caulim, celulose, carbonato de cálcio, silicato de cálcio ou fosfato dicálcico. Agentes aromatizantes adequados incluem óleo de hortelã-pimenta, óleo de gaultéria, aromatizante de cereja, laranja ou framboesa. Agentes de revestimento adequados incluem polímeros ou copolímeros ou ácido acrílico e/ou ácido metacrílico e/ou seus ésteres, ceras, ácidos graxos, zeína, goma-laca ou glúten. Conservantes adequados incluem benzoato de sódio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno ou bissulfito de sódio. Lubrificantes adequados incluem estearato de magnésio, ácido esteárico, oleato de sódio, cloreto de sódio ou talco. Agentes retardantes adequados incluem monoestearato de

glicerilo ou diestearato de glicerilo.

[00142] Formas líquidas para administração oral podem conter, além dos agentes acima, um transportador líquido. Veículos líquidos apropriados incluem água, óleos como o azeite, óleo de amendoim, óleo de gergelim, óleo de girassol, óleo de cártamo, óleo de amendoim, óleo de coco, parafina líquida, etileno glicol, propileno glicol, polietileno glicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, álcoois graxos, triglicerídeos ou suas misturas.

[00143] Suspensões para administração oral podem ainda incluir agentes de dispersão e/ou agentes de suspensão. Agentes de suspensão apropriados incluem carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroxipropil metilcelulose, polivinilpirrolidona, alginato de sódio ou álcool cetílico. Agentes de dispersão apropriados incluem lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos graxos como o ácido esteárico, polioxietileno sorbitol mono- ou di-oleato, -estearato ou -laurato, polioxietileno sorbitano mono- ou di-oleato, -estearato ou -laurato e afins.

[00144] Emulsões para administração oral podem ainda incluir um ou mais agentes emulsionantes. Agentes emulsionantes apropriados incluem agentes de dispersão, como exemplificado acima ou gomas naturais tais como goma acácia ou goma tragacanto.

[00145] Composições farmacêuticas da presente invenção podem ser preparadas por combinação, moagem, homogeneização, suspensão, dissolução, emulsão, dispersão e/ou mistura do primeiro composto ou seu sal farmacêuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido e pelo menos um agente de redução lipídica, por exemplo, fibrato e opcionalmente a(s) estatina (s) em conjunto com o(s) excipiente(s), transportador(es), adjuvante(s) e/ou diluente(s) selecionado(s). Um tipo de composição farmacêutica da presente invenção sob a forma de um comprimido ou cápsula pode ser preparado

(a) preparando um primeiro comprimido compreendendo pelo menos uma das substâncias ativas selecionadas a partir do primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido e pelo menos um agente de redução lipídica juntamente com qualquer/quaisquer excipiente(s), transportador(es), adjuvante(s) e/ou diluente(s) desejados e (b) preparando um segundo comprimido ou cápsula, em que o segundo comprimido ou cápsula inclui a ou as restantes substâncias ativas e o primeiro comprimido. Outro tipo de composição farmacêutica da presente invenção sob a forma de uma cápsula pode ser preparado (a) preparando uma primeira cápsula compreendendo pelo menos uma das substâncias ativas selecionadas a partir do primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido e o ou os agentes de redução lipídica juntamente com qualquer/quaisquer excipiente(s), transportador(es), adjuvante(s) e/ou diluente(s) desejados e (b) preparando uma segunda cápsula, em que a segunda cápsula inclui a ou as restantes substâncias ativas e a primeira cápsula. Um outro tipo de composição farmacêutica da presente invenção sob a forma de um comprimido pode ser preparado (a) preparando uma cápsula compreendendo pelo menos uma das substâncias ativas selecionadas a partir de um primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido e pelo menos um agente de redução lipídica juntamente com qualquer/quaisquer excipiente(s), transportador(es), adjuvante(s) e/ou diluente(s) desejados e (b) preparando um comprimido, em que o comprimido inclui a ou as restantes substâncias ativas e a cápsula.

[00146] Em modalidades, o ou os agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) e/ou estatinas são usados como comprimidos de liberação imediata ou como comprimido de liberação prolongada. É particularmente eficaz quando fornecido em um comprimido de

liberação prolongada. Comprimidos de liberação prolongada de vários agentes de redução lipídica estão disponíveis comercialmente. É preferível para ação prolongada que o comprimido se apresente em um formato de liberação prolongada.

[00147] Em outra modalidade, a composição farmacêutica da presente invenção compreende uma cápsula contendo um ou mais agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) e/ou estatina(s) dentro de uma cápsula contendo um composto primeiro ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido. Normalmente, sob esta forma, o ou os agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama ou fibrato(s) e/ou estatinas são apresentados em forma de liberação imediata. Nesse caso é usual administrar a composição três vezes ao dia. Outro modo de administração é fornecer uma composição contendo o ou os agonista(s) PPAR-alfa, agonista(s) PPAR-delta, agonista(s) dual(duais) PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato(s) e/ou estatina(s) quer em forma de liberação prolongada ou em forma de liberação não-prolongada como descrito acima, duas vezes por dia, em que a quantidade diária de composição administrada contém quantidade suficiente de substâncias ativas para fornecer a dose diária desejada ao paciente.

[00148] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da invenção se apresentam em uma forma de dosagem que compreende um primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg ou 5-25 mg. Em uma modalidade, a quantidade total é administrada via oral uma vez por dia.

[00149] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da

invenção se apresentam em uma forma de dosagem que compreende um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato, e/ou estatina em uma quantidade diária total de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg ou 100-300 mg, mais tipicamente de cerca de 200 mg. Em uma modalidade, a quantidade total é administrada via oral uma vez por dia. Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da invenção se apresentam em uma forma de dosagem que compreende uma estatina em uma quantidade de 5-1000 mg, 10-800 mg, 20-500 mg, 30-400 mg ou 40-200 mg.

[00150] Em modalidades, as composições da invenção se apresentam em uma forma de dosagem que compreende um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato, e/ou estatina em uma quantidade diária total de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg ou 100-300 mg, mais tipicamente cerca de 200 mg, contidos dentro de uma cápsula que contém o primeiro composto em uma quantidade de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg ou 5-25 mg. Em uma modalidade, o agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato, e/ou estatina se apresentam em forma de liberação prolongada.

[00151] Em modalidades, as composições da invenção se apresentam em uma forma de dosagem que compreende um comprimido de liberação prolongada de bezafibrato, em uma quantidade de 10-1000 mg, 20-800 mg, 50-500 mg, 80-400 mg ou 100-300 mg, mais tipicamente de cerca de 200 mg, contidos em uma cápsula que contém o primeiro composto em uma quantidade de 0,1-1500 mg, 0,2-1200 mg, 0,3-1000 mg, 0,4-800 mg, 0,5-600 mg, 0,6-500 mg, 0,7-400 mg, 0,8-300 mg, 1-200 mg, 1-100 mg, 1-50 mg, 1-30 mg, 4-26 mg ou 5-25 mg. Desta forma, o paciente a quem a dosagem é administrada recebe um comprimido de liberação prolongada

de bezafibrato que é administrado ao antro distal quando a cápsula quebra e libera o primeiro composto.

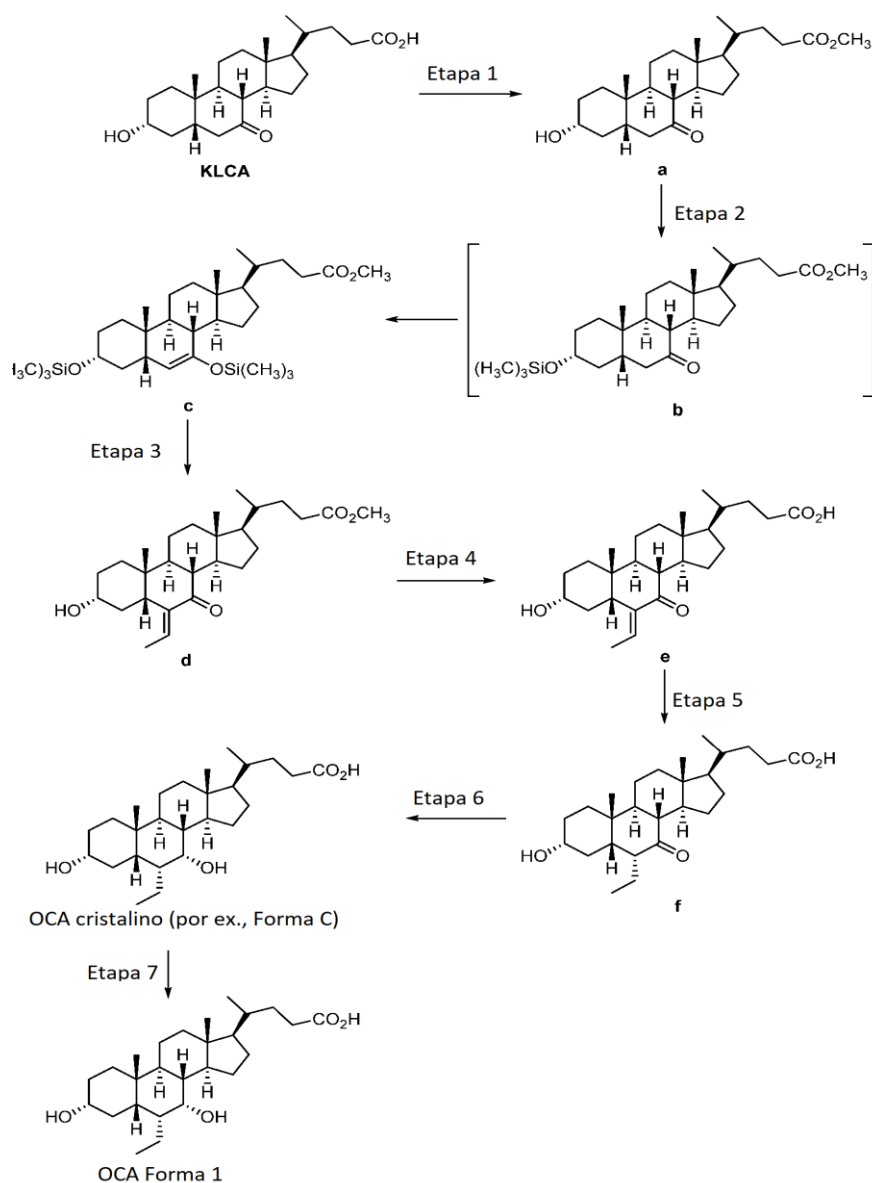
[00152] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada ao longo da vida pelo paciente, prolongando a sobrevivência e atrasando o transplante hepático. A redução de hiperlipidemia e enzimas hepáticas garante a redução do desenvolvimento de doença vascular associada. Tanto o primeiro composto como os agentes de redução lipídica, tais como fibratos e/ou estatinas, têm perfil de efeito colateral a longo prazo mínimo (com algumas exceções para o bezafibrato) e, portanto, é provável que esta combinação seja a terapia de eleição para cirrose biliar primária (PBC) com hiperlipidemia e para cirrose biliar primária resistente (PBC). Devido à dosagem simplificada fornecida pela presente invenção, uma terapia combinada da presente invenção pode ser utilizada no aumento de doses, dependendo do peso do paciente e da sua resposta clínica.

[00153] Uma composição da presente invenção que compreende um primeiro composto ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou agonista PPAR-alfa e gama, ou fibrato, e/ou uma estatina pode ser fornecida como as três substâncias ativas dentro de uma cápsula única. Em uma forma de tal composição, uma estatina pode ser misturada com um primeiro composto em uma cápsula interna, a cápsula interna sendo rodeada por um agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama, ou fibrato contidos em uma cápsula externa. Os locais dentro das cápsulas podem ser revertidos. Ou seja, a mistura de uma estatina e de um primeiro composto pode estar contida dentro da cápsula externa e o agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta ou agonista dual PPAR-alfa e gama, ou fibrato podem estar contidos dentro da cápsula interna. Esta disposição será especialmente desejável

se a quantidade de estatina a ser administrado for relativamente grande. São possíveis outras combinações para administração da combinação de três substâncias ativas.

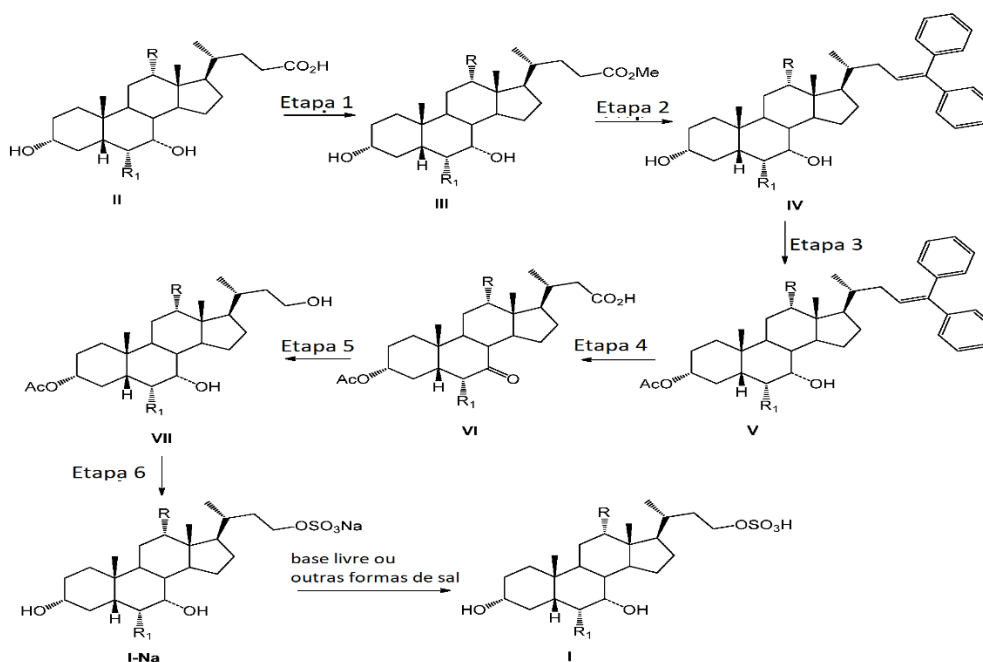
[00154] Os primeiros compostos divulgados neste documento podem ser preparados pelos métodos convencionais (por exemplo, os descritos em Publicação E.U.A nº 2009/0062526, Patente dos E.U.A nº 7,138,390 e WO 2006/122977), tais como por uma síntese de 6 etapas, seguida de uma etapa de purificação para produzir Composto 1 de elevada pureza (ácido obeticólico ou OCA), como mostrado no Esquema 1 abaixo.

### Esquema 1



[00155] O processo acima foi descrito em WO 2013/192097, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade. O processo é uma síntese de 6 etapas, seguida de uma etapa de purificação. A etapa 1 é a esterificação do ácido carboxílico C-24 de ácido litocólico 7-keto (KLCA) para produzir o composto de metiléster a. A etapa 2 é formação de éter de sililenol do composto 1 para produzir o composto c. A etapa 3 é uma reação de condensação de aldol do composto de éter sililenol c e acetaldeído para produzir o composto d. A etapa 4 é a saponificação do composto d para produzir o composto e. A etapa 5 é a hidrogenação do composto e para produzir o composto f. A etapa 6 é a redução seletiva do grupo 7-keto do composto f para produzir Composto 1 cristalino. A etapa 7 é a conversão de um composto cristalino em um Composto 1 amorfo (ácido obeticólico Forma 1, ou OCA Forma 1).

[00156] Alternativamente, o primeiro composto divulgado neste documento pode ser preparado pelos métodos convencionais (por exemplo, os descritos na Patente dos E.U.A. nº 7,932,244), ou através de um processo como mostrado no Esquema 2 (e divulgado em WO 2014/066819). O esquema 2 pode ser usado para preparar os Compostos 2, 3 ou 4 divulgados neste documento.





[00157] A etapa 1 é a esterificação de um composto de fórmula II para obter um composto de fórmula III. A etapa 2 é uma reação para formar um composto de fórmula IV a partir de um composto de fórmula III. A etapa 3 é a proteção do grupo hidróxi na posição C3 de um composto de fórmula IV para dar origem a um composto de fórmula V. A etapa 4 é a clivagem oxidativa do composto de fórmula V para dar origem a um composto de fórmula VI. A etapa 5 é a redução de um composto de fórmula VI para dar origem a um composto de fórmula VII. A etapa 6 é a sulfonação de um composto de fórmula VII para dar origem a um sal de fórmula I-Na. Um sal de fórmula I-Na pode ser convertido para a sua forma base livre (ou seja, um composto de fórmula I) ou outras formas de sal (por exemplo, um sal de fórmula I-(Et)<sub>3</sub>NH).

#### DEFINIÇÕES

[00158] Para conveniência, certos termos utilizados no relatório descritivo, exemplos e reivindicações em anexo são recolhidos aqui.

[00159] Como usado neste documento, o termo "fibrato" significa qualquer um dos derivados do ácido fibríco e derivados farmacêuticamente ativos do ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico úteis nos métodos aqui descritos. Exemplos de fibratos incluem, mas não estão limitados a, fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, etofibrato, gemfibrozil, nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, sinfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrada, etc. Exemplos de fibratos também são descritos nas Patentes dos E.U.A. N.ºs. 3,781,328, 3,948,973, 3,869,477, 3,716,583, 3,262,580, 3,723,446, 4,058,552, 3,674,836, 3,369,025, 3,984,413, 3,971,798, 6,384,062, 7,119,198 e 7,259,186; Pub. dos E.U.A. N.º 20090131395; WO2008/039829; patente belga nº 884722; patente do Reino Unido nº 860303; e publicação do pedido de patente europeia nº EP0607536, cujas divulgações inteiras são incorporadas aqui por referência.

[00160] O receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma

(PPAR-alfa), também conhecido como NR1C1 (subfamília de receptor nuclear 1, grupo C, membro 1), é uma proteína de receptor nuclear. Um agonista PPAR-alfa se liga a, e ativa, PPAR-alfa. Exemplos de um agonista PPAR-alfa incluem, mas não estão limitados a, um fibrato, tais como os fibratos aqui descritos.

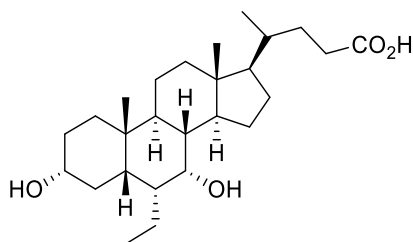
[00161] O receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-delta), também conhecido como NR1C2 (subfamília de receptor nuclear 1, grupo C, membro 2), é uma proteína de receptor nuclear. Um agonista PPAR-delta se liga a, e ativa, PPAR-delta. Exemplos de um agonista PPAR-delta incluem, mas não se limitam a, ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il}metil)sulfanil]-2-metilfenoxi}acético, (também conhecido na técnica como GW501516, GW1516 e Endurabol), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]-fenóxi}-acético e ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metil fenóxi]-acético.

[00162] Um agonista dual PPAR-alfa e delta ou PPAR-alfa e gama se liga a, e ativa, PPAR-alfa e PPAR-delta ou PPAR-alfa e PPAR-gama. Exemplos de agonista dual PPAR-alfa e delta incluem, mas não se limitam a ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico (também conhecido como GFT505). Exemplos de agonista dual PPAR-alfa e gama incluem, mas não se limitam a, aleglitazar (ácido (2S)-2-metoxi-3-[4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)etoxi]-7-benzotiofenil]propanoico), CAS No. 475479-34-6), muraglitazar N-[(4-metoxifenoxi)carbonil]-N-{4-[2-(5-metil-2-fenil-1,3-oxazol-4-il)etoxi]benzil}glicina, CAS No. 331741-94-7), tesaglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico), CAS No. 251565-85-2) e saroglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-(2-{2-metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol-1-il}etoxi)fenil]propanoico), CAS No. 495399-09-2).

[00163] Como usado aqui, o termo "agonista FXR" se refere a

qualquer composto que ativa FXR. Em um aspecto, um agonista FXR atinge pelo menos 50% de ativação de FXR em relação a CDCA, o controle positivo apropriado nos métodos de ensaio descritos em WO 2000/037077. Em outro aspecto, um agonista FXR atinge 100% de ativação de FXR no ensaio de proximidade de cintilação ou no ensaio HTRF, conforme descrito em WO2000/037077. Exemplos de agonistas FXR incluem mas não estão limitados aos descritos nas patentes dos E.U.A. 7,138,390; 7,932,244; 20120283234; 20120232116; 20120053163; 20110105475; 20100210660; 20100184809; 20100172870; 20100152166; 20100069367; 20100063018; 20100022498; 20090270460; 20090215748; 20090163474; 20090093524; 20080300235; 20080299118; 20080182832; 20080039435; 20070142340; 20060069070; 20050080064; 20040176426; 20030130296; 20030109467; 20030003520; 20020132223; e 20020120137.

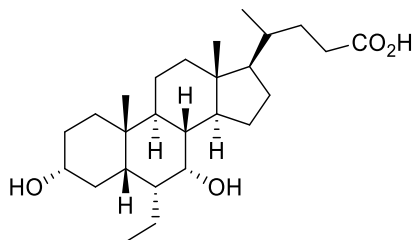
[00164] Como usado aqui, o termo "ácido obeticólico" ou "OCA" se refere a um composto com a estrutura química:



[00165] O ácido obeticólico é também referido como ácido obeticólico Forma 1, INT-747, 3 $\alpha$ , ácido 7 $\alpha$ -dihidroxi-6 $\alpha$ -etil-5 $\beta$ -colan-24-oico, ácido 6 $\alpha$ -etil-quenodeoxicólico, 6-etil-CDCA, 6ECDCA, ácido colan-24-oico, 6-etil-3,7-dihidroxi-(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ , 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ), e pode ser preparado pelos métodos descritos na Publicação dos E.U.A. Nº 2009/0062526 A1, Patente dos E.U.A. Nº 7,138,390 e WO2006/122977. O número de registro CAS para o ácido obeticólico é 459789-99-2.

[00166] Como usado aqui, o termo "ácido obeticólico cristalino" se refere a qualquer forma cristalina de um composto com a estrutura

química:



[00167] Ácido obeticólico cristalino significa que o composto se cristaliza em uma disposição de pacote de cristal específica em três dimensões espaciais ou o composto tendo planos de face externos. A forma cristalina de ácido obeticólico (ou um seu sal farmaceuticamente aceitável) pode cristalizar em diferentes disposições de pacote de cristal, em que todas têm a mesma composição elementar de ácido obeticólico. Formas diferentes de cristal geralmente têm diferentes padrões de difração de raios X, espectros de infravermelhos, pontos de fusão, dureza de densidade, forma de cristal, propriedades ópticas e elétricas, estabilidade e solubilidade. Solvente de recristalização, taxa de cristalização, temperatura de armazenamento e outros fatores podem fazer com que uma forma de cristal seja preponderante. Cristais de ácido obeticólico podem ser preparados por cristalização sob condições diferentes, por exemplo, diferentes solventes, temperaturas, etc. Exemplos de formas cristalinas de OCA são descritos na Patente dos E.U.A. nº 9,238,673.

[00168] O termo "primeiro composto" significa um composto de fórmula A, I, IA, II ou ou IIA, ou Composto 1, 2, 3, ou 4, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido. Sempre que o termo é usado no contexto da presente invenção deve ser entendido que está a ser feita referência à base livre, um composto marcado isotopicamente, um composto cristalino ou um seu sal farmacêuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido, desde que tal seja possível e/ou apropriado nas circunstâncias em causa.

[00169] Como usado aqui, o termo "conjugados de aminoácidos" se

refere a conjugados de um primeiro composto da presente invenção (por exemplo, um composto de fórmula A) com qualquer aminoácido adequado. Por exemplo, um conjugado de aminoácido apropriado de um composto de fórmula A terá a vantagem adicional de uma maior integridade nos fluidos da bÍlis ou fluidos intestinais. Aminoácidos adequados incluem, mas não estão limitados a, glicina e taurina. Assim, a presente invenção compreende os conjugados de glicina e taurina de um primeiro composto da presente invenção (por exemplo, Composto 1).

[00170] O termo "estatina" é sinônimo dos termos "inibidor da redutase 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima" e "inibidor da redutase HMG-CoA". Estes termos são usados permutavelmente neste documento. Como sugerem os sinônimos, as estatinas são inibidores da redutase 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A e, como tal, são eficazes em baixar o nível de colesterol do plasma sanguíneo e conseqüentemente no tratamento ou prevenção de doenças cardiovasculares. As estatinas e seus sais farmaceuticamente aceitáveis são particularmente úteis em baixar os níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) em mamíferos e particularmente em seres humanos. Estruturalmente, as estatinas ou seus derivados têm em comum um sistema 4-hidroxi-6-oxo-2H-pirano, que também pode estar na forma de ácido dihidróxi que interage com o sítio ativo da redutase HMG-CoA e uma parte lipofÍlica que se apresenta em especial como um sistema hexahidronaftalênico polissubstituído, mas que também pode ser substituída por um sistema heteroaromático de polissubstituído como na atorvastatina ou fluvastatina. A estatina apropriada para o uso neste documento inclui, mas não se limita a, sinvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, di-hidrocompactina e compactina ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

[00171] O termo "agente de redução lipídica" refere-se a qualquer agente que seja capaz de reduzir a concentração de lipídios (por exemplo, colesterol, LDL e triglicerídeos) em circulação (por exemplo, no sangue). Um agente de redução lipídica inclui, mas não se limita a, (i) um sequestrador de ácidos biliares, tal como uma resina (por exemplo, colestiramina, colestipol, colesevelam), (ii) um inibidor de absorção de colesterol, que impede a absorção do colesterol (por exemplo, do intestino delgado para o sistema circulatório), tal como a ezetimiba (ou seja, (3R,4S)-1-(4-fluorofenil)-3-[(3S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroxipropil]-4-(4-hidroxifenil)azetidin-2-ona) e (3R,4S)-1,4-bis(4-metoxifenil)-3-(3-fenilpropil)-2-azetidinona, (iii) etil ésteres de ácido graxo ômega-3, incluindo derivados de ácidos graxos livres (por exemplo, Omacor®, Lovaza®, Vascepa™, Epadel, Epanova™), ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 de derivados marinhos (PUFA), (iv) inibidores de PCSK9, (v) ácido nicotínico, (vi) fitoesteróis (por exemplo, esteróis e estanois vegetais), tais como  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, ergosterol,  $\beta$ -sitostanol, campestanol, estigmastanol, cicloartenol e lupeol, (vii) inibidores de CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado), tal como Anacetrapib, Evacetrapib, Torcetrapib e Dalcetrapib, (viii) inibidores da sintase de esqualeno, (ix) oligonucleotídeos antissenso que afetam a síntese, degradação, absorção e metabolismo de lipídios (por exemplo, oligonucleotídeos antissenso que ligam ao mRNA que codifica a apolipoproteína B ou PCSK9) (por exemplo, Mipomersen (Kynamro)), (x) inibidores da apoproteína B, (xi) inibidores da proteína de transporte de triglicerídeos microssomal (por exemplo, Lomitapida (Juxtapid)) e (xii) outros compostos como colesevelam, avasimiba e implitapida.

[00172] "Tratar", inclui qualquer efeito, por exemplo, diminuir, reduzir, modular ou eliminar, que resulte na melhoria da condição, doença, transtorno, etc. "Tratar" ou "tratamento" de um estado de doença inclui:

inibir o estado de doença, ou seja, deter o desenvolvimento do estado de doença ou seus sintomas clínicos, ou aliviar o estado de doença, ou seja, causar a regressão temporária ou permanente do estado de doença ou seus sintomas clínicos.

[00173] "Prevenir" o estado de doença inclui fazer com que os sintomas clínicos do estado de doença não se desenvolvam em um sujeito que pode estar exposto ou predisposto para o estado de doença, mas que ainda não sinta ou exiba sintomas do estado de doença.

[00174] O termo "inibir" ou "inibição", como usado aqui, refere-se a qualquer efeito positivo detetável sobre o desenvolvimento ou progressão de uma doença ou condição. Um tal efeito positivo pode incluir o retardar ou prevenir do aparecimento de pelo menos um sintoma ou sinal da doença ou condição, alívio ou reversão do ou dos sintomas ou sinais e retardar ou prevenir o agravamento adicional do ou dos sintomas ou sinais.

[00175] "Estado de doença" significa qualquer doença, condição, sintoma ou indicação.

[00176] O termo "quantidade eficaz" ou "quantidade terapêuticamente eficaz" como usado neste documento se refere a uma quantidade de um primeiro composto (por exemplo, um ligando ativador de FXR), ou um fibrato ou um agente de redução lipídica, ou uma estatina, que produz um efeito terapêutico agudo ou crônico após administração de dose adequada, isoladamente ou em combinação. Em uma modalidade, uma quantidade eficaz ou quantidade terapeuticamente eficaz de um primeiro composto (por exemplo, um ligando ativador de FXR) produz um efeito terapêutico agudo ou crônico, após administração de dose adequada em combinação com pelo menos um fibrato. O efeito inclui a prevenção, correção, inibição ou reversão dos sintomas, sinais e patologia subjacente de uma doença/condição (por exemplo, fibrose do fígado, rim ou intestino) e complicações relacionadas com qualquer

medida detetável. Uma "quantidade eficaz" ou "quantidade terapêuticamente eficaz" irá variar dependendo do primeiro composto, do fibrato, do agente de redução lipídica, da estatina, da doença e sua gravidade, e da idade, peso, etc., do sujeito a ser tratado.

[00177] Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um primeiro composto pode ser formulada em conjunto com um ou mais fibratos e, opcionalmente, um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis para administração a um ser humano ou a um animal não humano. Consequentemente, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada, por exemplo, por via oral, parenteral ou tópica, para fornecer uma quantidade eficaz do primeiro composto e do ou dos fibratos. Em modalidades alternativas, as composições da invenção podem ser usadas para revestir ou impregnar um dispositivo médico, por exemplo, um *stent*.

[00178] "Efeito farmacológico" como usado aqui abrange efeitos produzidos no sujeito que atingem o objetivo pretendido de uma terapia. Em uma modalidade, um efeito farmacológico significa que indicações primárias do sujeito a ser tratado são prevenidas, atenuadas ou reduzidas. Por exemplo, um efeito farmacológico seria aquele que resulta na prevenção, atenuação ou redução de indicações primárias em um sujeito tratado. Em outra modalidade, um efeito farmacológico significa que distúrbios ou sintomas das indicações primárias do sujeito a ser tratado são prevenidas, atenuadas ou reduzidas. Por exemplo, um efeito farmacológico seria aquele que resulta na prevenção, atenuação ou redução de distúrbios ou sintomas em um sujeito tratado.

[00179] Deve ser entendido que os isômeros decorrentes de átomos de carbono assimétricos (por exemplo, todos os enantiômeros e diastereômeros) estão incluídos no escopo da invenção, salvo indicação em contrário. Tais isômeros podem ser obtidos em forma substancialmente pura por técnicas de separação clássicas e por síntese controlada estereoquimicamente.



[00180] Uma "composição farmacêutica" é uma formulação que contém agentes terapêuticos tais como um primeiro composto e um agente de redução lipídica, tal como um fibrato, em uma forma adequada para administração a um sujeito. Em uma forma de realização, a composição farmacêutica é em granel ou em forma de dose unitária. Pode ser vantajoso formular composições em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária, como aqui utilizada, se refere a unidades fisicamente discretas, adequadas como dosagens unitárias para o sujeito a ser tratado, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de reagente ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dosagem unitária da invenção é ditada por, e é diretamente dependente de, as características únicas dos agentes ativos e do efeito terapêutico particular a ser alcançado e das limitações inerentes na técnica de composição de um tal agente ativo para o tratamento de indivíduos.

[00181] O termo "forma de dosagem unitária" se refere a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para humanos e outros mamíferos, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com um excipiente farmacêutico adequado como aqui descrito.

[00182] A forma de dosagem unitária é qualquer uma de uma variedade de formas, incluindo, por exemplo, uma cápsula, um saco IV, um comprimido, uma bomba única em um inalador de aerossóis, ou um frasco. A quantidade de primeiro composto ou um seu sal farmacêuticamente aceitável ou conjugado de aminoácido em uma dose unitária da composição é uma quantidade eficaz e varia de acordo com o tratamento específico envolvido e/ou o ou os agentes de redução

lipídica usados para o tratamento. Um entendido na técnica saberá que é por vezes necessário fazer variações de rotina à dosagem dependendo da idade e estado clínico do paciente. A dosagem dependerá também da via de administração. São contempladas várias vias, incluindo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inalatória, bucal, sublingual, intrapleural, intratecal e semelhantes. Formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de um composto desta invenção incluem pós, pulverizações, unguentos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, pensos e inalantes. Em uma modalidade, o primeiro composto e/ou agente de redução lipídica é misturado sob condições de esterilização com um transportador farmacologicamente aceitável e com quaisquer conservantes, tampões ou propulsores que se revelem necessários.

[00183] O termo "dose flash" refere-se a formulações que são formas de dosagem de dispersão rápida.

[00184] O termo "liberação imediata" é definido como uma liberação de um agente terapêutico (tal como um primeiro composto ou agente de redução lipídica) de uma forma de dosagem em um período de tempo relativamente breve, geralmente até cerca de 60 minutos. O termo "liberação modificada" está definido para incluir a liberação retardada, liberação prolongada, e liberação pulsada. O termo "liberação pulsada" é definido como uma série de liberações de fármaco de uma forma de dosagem. O termo "liberação sustentada" ou "liberação prolongada" é definido como a liberação contínua de um agente terapêutico de uma forma de dosagem durante um período prolongado.

[00185] Um "sujeito" inclui mamíferos, por exemplo, seres humanos, animais de companhia (por exemplo, cães, gatos, pássaros e afins), animais de fazenda (por exemplo, vacas, ovelhas, porcos, cavalos, aves e afins) e animais de laboratório (por exemplo, ratos, camundongos,

porquinhos da Índia, pássaros e afins). Em uma modalidade, o sujeito é um humano. Em um aspecto, o sujeito é fêmea. Em um aspecto, o sujeito é macho.

[00186] Como aqui usado, o termo "farmaceuticamente aceitável" se refere aos compostos, materiais, composições, veículos e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo da avaliação médica razoável, adequados para utilização em contacto com os tecidos de seres humanos e animais sem excessiva toxicidade, irritação ou resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurável com um rácio razoável de benefício/ risco.

[00187] "Transportador farmaceuticamente aceitável" significa um transportador ou excipiente que é útil na preparação de uma composição farmacêutica que é geralmente segura, não tóxica e nem biologicamente nem de outra forma indesejável, e inclui um excipiente que seja aceitável para uso veterinário, bem como para uso humano farmacêutico. Um "excipiente farmaceuticamente aceitável" como usado em este relatório descritivo e nas reivindicações inclui um ou mais de um tal excipiente.

[00188] Embora seja possível administrar o primeiro composto diretamente sem qualquer formulação, o primeiro composto pode ser administrado sob a forma de uma formulação farmacêutica compreendendo um excipiente farmaceuticamente aceitável. Esta formulação pode ser administrada por uma variedade de vias, incluindo oral, bucal, retal intranasal, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular e intranasal.

[00189] Em uma modalidade, o primeiro composto pode ser administrado transdermicamente. A fim de administrar transdermicamente, é necessário um dispositivo de administração transdérmica ("adesivo"). Tais adesivos transdérmicos podem ser usados para fornecer infusão contínua ou descontínua de um composto da presente

invenção em quantidades controladas. A construção e utilização de adesivos transdérmicos para a administração dos agentes farmacêuticos é bem conhecida na técnica. Ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 5,023,252. Tais adesivos podem ser construídos para administração contínua, pulsátil ou sob demanda de agentes farmacêuticos.

[00190] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da presente invenção é adaptada para administração bucal e/ou sublingual ou nasal. Esta modalidade fornece administração do primeiro composto de forma a evitar complicações gástricas, tais como metabolismo de primeira passagem pelo sistema gástrico e/ou através do fígado. Esta via de administração também pode reduzir os tempos de adsorção, proporcionando o início mais rápido de benefícios terapêuticos.

[00191] O primeiro composto pode ser administrado em uma ampla faixa de dosagem. Por exemplo, as dosagens diárias normalmente ficam no intervalo de cerca de 0,0001 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal. No tratamento de seres humanos adultos, pode ser usado o intervalo de cerca de 0,1 a cerca de 15 mg/kg/dia, em dose única ou dividida. Em uma modalidade, a formulação compreende cerca de 0,1 mg a cerca de 1500 mg de um primeiro composto. Em outra modalidade, a formulação compreende cerca de 1 mg a cerca de 100 mg de um primeiro composto. Em outra modalidade, a formulação compreende cerca de 1 mg a cerca de 50 mg de um primeiro composto. Em outra modalidade, a formulação compreende cerca de 1 mg a cerca de 30 mg de um primeiro composto. Em outra modalidade, a formulação compreende cerca de 4 mg a cerca de 26 mg de um primeiro composto. Em outra modalidade, a formulação compreende cerca de 5 mg a cerca de 25 mg de um primeiro composto. Contudo, será entendido que a quantidade de primeiro composto realmente administrado será determinada por um médico, tendo em conta as circunstâncias relevantes, incluindo a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, a forma do primeiro composto administrado, o ou

os agentes de redução lipídica administrados, a idade, peso e resposta do paciente individual e a gravidade dos sintomas do paciente. Portanto, os intervalos de dosagem acima não se destinam a limitar de maneira nenhuma o escopo da invenção. Em alguns casos, os níveis de dosagem abaixo do limite inferior do intervalo citado podem ser mais que suficientes, enquanto em outros casos podem ser usadas doses ainda maiores sem causar qualquer efeito colateral nocivo, desde que tais doses maiores sejam primeiramente divididas em várias doses menores para administração ao longo do dia.

[00192] "Fibrose" se refere a uma condição envolvendo o desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso excessivo, por exemplo, tecido cicatricial, em um tecido ou órgão. Tal geração de tecido cicatricial pode ocorrer em resposta a infecção, inflamação ou lesão do órgão devido a uma doença, trauma, toxicidade química e assim por diante. A fibrose pode desenvolver-se em uma variedade de diferentes tecidos e órgãos, incluindo o fígado, rim, intestino, pulmão, coração, etc.

[00193] Tal como aqui utilizado, uma "condição colestática" refere-se a qualquer doença ou condição em que a excreção de bÍlis a partir do fígado é diminuída ou bloqueada, o que pode ocorrer quer no fígado quer nos canais biliares. A colestase intra-hepática e colestase extra-hepática são os dois tipos de afeções colestáticas. A colestase intra-hepática (que ocorre no interior do fígado) é mais comum em cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, sépsis (infecção generalizada), hepatite alcoólica aguda, toxicidade do fármaco, nutrição parentérica total (ser alimentado por via intravenosa), malignidade, fibrose cística, atresia biliar e gravidez. A colestase extra-hepática (que ocorre fora do fígado) pode ser causada por tumores do ducto biliar, estenoses, cistos, divertículos, formação de pedra no ducto biliar comum, pancreatite, tumor pancreático ou pseudocisto, e compressão devido a uma massa ou tumor em um órgão próximo.

[00194] Os sinais e sintomas clínicos de uma condição colestática incluem: comichão (prurido), fadiga, pele ou olhos amarelados, incapacidade de digerir certos alimentos, náuseas, vômitos, fezes claras, urina escura e dor abdominal no quadrante superior direito. Um paciente com uma condição colestática pode ser diagnosticado e seguido clinicamente com base em um conjunto de ensaios laboratoriais clínicos convencionais, incluindo a medição de níveis de fosfatase alcalina,  $\gamma$ -glutamil transferase transpeptidase (GGT), 5' -nucleotidase, bilirrubina, ácidos biliares e colesterol no soro sanguíneo de um paciente. De um modo geral, um paciente é diagnosticado como tendo uma condição colestática se os níveis de soro de todos os três marcadores de diagnóstico da fosfatase alcalina, GGT e 5' nucleotidase forem considerados anormalmente elevados. O nível de soro normal destes marcadores pode variar em algum grau de laboratório para laboratório e de procedimento para procedimento, dependendo do protocolo de teste. Deste modo, um médico será capaz de determinar, com base no procedimento de laboratório e de ensaio específicos, o que é um nível no sangue anormalmente elevado para cada um dos marcadores. Por exemplo, um paciente que sofre de uma condição colestática tem geralmente mais do que cerca de 125 IU/L de fosfatase alcalina, mais do que cerca de 65 IU/L de GGT e mais do que cerca de 17 NIL de 5"nucleotidase no sangue. Devido à variabilidade do nível de marcadores de soro, uma condição colestática pode ser diagnosticada com base em níveis anormais destes três marcadores para além de pelo menos um dos sintomas acima mencionados, tais como comichão (prurido).

[00195] O termo "cirrose biliar primária", frequentemente abreviado para PBC, é uma doença auto-imune do fígado marcada pela destruição lenta e progressiva das pequenas vias biliares do fígado, com os ductos intralobulares (Canais de Hering) sendo afectados no início da doença.

Quando estes ductos são danificados, a bÍlis acumula-se no fÍgado (colestase) e ao longo do tempo danifica o tecido. Isso pode levar a cicatrizes, fibrose e cirrose. A cirrose biliar primária é caracterizada pela destruição do ducto biliar interlobular. As descobertas histopatológicas da cirrose biliar primária incluem: inflamação das vias biliares, caracterizada por linfÓcitos intra-epiteliais e granulomas epitelioides periductais. Existem 4 fases de PBC.

[00196] Fase 1 - Fase Portal: Tríades de tamanho normal; inflamação portal, danos subtis nas vias biliares. Granulomas são muitas vezes detectados em esta fase.

[00197] Fase 2 - Fase Periportal: Tríades alargadas; fibrose periportal e/ou inflamação. Tipicamente, esta fase é caracterizada pela descoberta de uma proliferação de pequenas vias biliares.

[00198] Fase 3 - Fase Septal: Septos fibrosos ativos e/ou passivos.

[00199] Fase 4 - Cirrose Biliar: Nódulos presentes; grinalda (garland).

[00200] O termo "colangite esclerosante primária" (PSC) é uma doença das vias biliares que provoca a inflamação e posterior obstrução das vias biliares, tanto a um nível intra-hepático (no interior do fÍgado) como extra-hepático (fora do fÍgado). A inflamação impede o fluxo da bÍlis para o intestino, o que em última instância pode levar a cirrose do fÍgado, insuficiência hepática e cÂncer do fÍgado.

[00201] O termo "esteato-hepatite não alcoólica" (NASH) é a inflamação do fÍgado causada por um acÚmulo de gordura no fÍgado. Em algumas pessoas, o acÚmulo de gordura provoca inflamação do fÍgado. Por causa da inflamação, o fÍgado não funciona tão bem como deveria. NASH pode piorar e causar cicatrizes do fÍgado, o que leva a cirrose. NASH é semelhante ao tipo de doença hepática causada pelo consumo prolongado e intenso de bebidas alcoÓlicas. Mas NASH ocorre em pessoas que não abusam do álcool.

[00202] O termo "Órgão" refere-se a uma estrutura diferenciada

(como um coração, pulmão, rim, fígado, etc.) que consiste de células e tecidos que executam uma função específica em um organismo. Este termo abrange também partes corporais que realizam uma função ou que cooperam em uma atividade (por exemplo, um olho e estruturas relacionadas que compõem os órgãos visuais). O termo "órgão" abrange ainda qualquer estrutura parcial de células e tecidos diferenciados que é potencialmente capaz de se desenvolver em uma estrutura completa (por exemplo, um lobo ou uma secção de um fígado).

[00203] Todas as publicações e documentos de patente aqui citados são aqui incorporados por referência como se cada tal publicação ou documento tivesse sido especifica e individualmente indicado para ser aqui incorporado por referência. A citação de publicações e documentos de patente não se destina a constituir um reconhecimento de que qualquer técnica anterior é pertinente, nem constitui qualquer reconhecimento em relação ao teor ou dados dos mesmos. Tendo a invenção sido agora descrita por meio de descrição escrita, os entendidos na técnica reconhecerão que a invenção pode ser colocada em prática em várias modalidades e que a descrição e exemplos aqui fornecidos servem propósitos ilustrativos e não representam qualquer limitação às reivindicações que se seguem.

[00204] No relatório descritivo, as formas singulares incluem o plural, a menos que o contexto dite claramente o contrário. A menos que definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado do comumente compreendido pelos entendidos na técnica à qual esta invenção pertence. Em caso de conflito, prevalecerá o presente relatório descritivo. Todas as porcentagens e rácios aqui usados, salvo indicação em contrário, são por peso.

### EXEMPLOS

#### **Exemplo 1: Modelo de ligação do ducto biliar (BDL)**



[00205] Este experimento foi realizado para avaliar os efeitos de OCA e atorvastatina isoladamente e em combinação, na fibrose induzida por ligação do ducto biliar em camundongos.

#### Animais, alojamento e dieta

[00206] Camundongos macho C57BL/6 (6 semanas de idade) foram obtidos da Japan SLC. Estes animais foram mantidos em uma instalação livre de patógenos específica sob condições controladas ( $23 \pm 2$  °C), umidade ( $45 \pm 10\%$ ), iluminação (ciclos artificiais de 12 horas de luz e escuridão; luz das 8:00 às 20:00), e troca de ar (taxa de troca de ar: mais do que 40 vezes/hora). Foi mantida uma pressão alta ( $20 \pm 4$  Pa) na sala experimental para evitar a contaminação da instalação. Os animais foram mantidos em KN-600 (Natsume Seisakusho, Japão) com um máximo de 6 camundongos por gaiola. Folhas de papel de limpeza esterilizado (Paper-Clean da Japan SLC) foram usadas para servir de cobertura ao leito e substituídas uma vez por semana. Uma dieta sólida rica em gordura esterilizada (HDF) e água foram fornecidas *ad libitum* durante 3 semanas antes do dia da cirurgia.

#### Grupos de tratamento

##### **Grupo 1: Sham**

[00207] A camundongos sham-operados (n=8) foi administrado oralmente um veículo (0,5% de CMC), em um volume de 5 mL/kg, uma vez por dia, desde o dia 0 ao dia 6 após cirurgia BDL.

##### **Grupo 2: Veículo BDL**

[00208] A camundongos BDL-operados (n=12) foi administrado oralmente um veículo (0,5% de CMC), em um volume de 5 mL/kg, uma vez por dia, desde o dia 0 até ao dia 6 após cirurgia BDL.

##### **Grupo 3: BDL-OCA**

[00209] A camundongos BDL-operados (n=12) foi administrado oralmente um veículo suplementado com OCA em uma dose de 5 mg/kg, uma vez por dia, desde o dia 0 até ao dia 6 após cirurgia BDL.

**Grupo 4: BDL-Atorvastatina**

[00210] A camundongos BDL-operados (n=12) foi administrado oralmente um veículo suplementado com atorvastatina em uma dose de 10 mg/kg, uma vez por dia, desde o dia 0 até ao dia 6 após cirurgia BDL.

**Grupo 5: OCA-BDL-Atorvastatina**

[00211] A camundongos BDL-operados (n=12) foi administrado oralmente um veículo suplementado com OCA em uma dose de 5 mg/kg e atorvastatina, em uma dose de 10 mg/kg, uma vez por dia, desde o dia 0 até ao dia 6 após cirurgia BDL.

**Cirurgia de ligação do ducto biliar**

[00212] Foi realizada cirurgia de ligação do ducto biliar no dia 0. Colestase, que leva à fibrose do fígado ao longo do tempo, foi estabelecida nos camundongos pela ligação do ducto biliar comum sob anestesia pentobarbital. Os camundongos foram divididos em duas coortes cirúrgicas com base no seu peso antes do dia da cirurgia. Após raspar o pelo, a cavidade abdominal foi aberta e o ducto biliar comum foi ligado duas vezes com seda cirúrgica 5-0 e o ducto biliar comum foi cortado entre as ligações. O peritônio e a pele foram fechados com suturas. Os camundongos foram transferidos para uma gaiola limpa (gaiola de repouso) para recuperação da anestesia. Camundongos sham foram operados de modo semelhante aos outros grupos, mas o ducto biliar não foi ligado.

**Monitoramento de animais e sacrifício**

[00213] A viabilidade, sinais clínicos e comportamento foram monitorados diariamente. O peso corporal foi gravado diariamente durante o período de tratamento. O consumo de alimentos foi medido duas vezes por semana por gaiola durante o período de tratamento. No dia 6, os animais foram sacrificados por exsanguinação através de punção cardíaca direta sob anestesia com éter (Wako Pure Chemical Industries).

### Análise histológica

[00214] Para visualizar a deposição de colágeno, secções de fígado laterais esquerdas fixadas em Bouin foram coradas usando solução de picro-Sirius red (Waldeck, Alemanha). Para análise quantitativa da área de fibrose, foram capturadas imagens de campo brilhante das secções coradas de Sirius red em torno da veia central usando uma câmera digital (DFC295; Leica, Alemanha) em ampliação de 100 vezes e as áreas positivas em 5 campos/secção foram medidas utilizando software ImageJ (National Institute of Health, E.U.A.). Foram realizadas análises estatísticas utilizando Prism Software 6 (GraphPad Software, Inc. E.U.A.).

### Resultados

[00215] Foram realizadas análises histopatológicas em secções de fígado (de acordo com métodos de rotina) por coloração Sirius-red para estimar a porcentagem de área de fibrose. Fotomicrografias representativas das secções de fígado coradas com Sirius red são mostradas nas Figuras 1A-1E. O grupo de veículo BDL mostrou um aumento significativo na área positiva de Sirius red em comparação com o grupo BDL-Sham. Como indicado na Tabela 1 e Figura 2, o grupo BDL-OCA+atorvastatina mostrou uma redução significativa na área positiva de Sirius red em comparação com o grupo de veículo BDL.

**TABELA 1**

Parâmetro (média ± SD)	Sham (n=8)	Veículo BDL (n=11)	BDL-OCA (n=12)	BDL-ATO (n=12)	BDL- OCA+ATO (n=12)
Área positiva de Sirius red (%)	1,30 ± 0,45	2,17 ± 0,43	2,06 ± 0,37	2,31 ± 0,63	1,60 ± 0,44 (p<0,05)

[00216] Os resultados na Tabela 1 indicam que a combinação de OCA e atorvastatina reduziu significativamente a fibrose.

### **Exemplo 2: NASH induzida por dieta em camundongos APOE\*3Leiden.CETP**

[00217] Este experimento foi realizado para avaliar os efeitos de

OCA e fenofibrato, isoladamente ou em combinação, no desenvolvimento de NASH e fibrose hepática induzidos por dieta em camundongos transgênicos APOE\*3Leiden.CETP. Perfis de expressão de gene hepático e subsequente análise de via foram realizados para determinar se a combinação regula novos genes não regulados quer por tratamento em monoterapia, e/ou regula mais fortemente genes também afetados pela monoterapia.

#### Animais, alojamento e dieta

[00218] Camundongos macho transgênicos APOE\*3Leiden.CETP (9-21 semanas de idade) foram obtidos e alojados em 2-5 camundongos por gaiola. Os camundongos foram alimentados com uma dieta rica em gordura contendo 24% de banha e 1% (p/p) de colesterol. O período de ensaio foi de 15 semanas na dieta rica em gordura. Na semana 16, os camundongos foram emparelhados com base na idade, peso corporal, colesterol plasmático e triglicerídeos após jejum de 4 horas.

#### Grupos de tratamento

##### **Grupo 1: O grupo de referência HFC inicia o tratamento**

[00219] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura durante o ensaio nas semanas 0 a 14.

##### **Grupo 2: Grupo de controle HFC**

[00220] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura nas semanas 0 a 24.

##### **Grupo 3: HFC + OCA**

[00221] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura suplementada com OCA com uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia desde a semana 16 até à 24.

##### **Grupo 4: HFC + fenofibrato em dose baixa**

[00222] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura suplementada com fenofibrato com uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia desde a semana 16 até à 24.

**Grupo 5: HFC + fenofibrato em dose elevada**

[00223] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura suplementada com fenofibrato com uma dose de 40 mg/kg uma vez por dia desde a semana 16 até à 24.

**Grupo 6: HFC + OCA + fenofibrato em dose baixa**

[00224] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura suplementada com OCA com uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia e fenofibrato com uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia desde a semana 16 até à 24.

**Grupo 7: HFC + OCA + fenofibrato em dose elevada**

[00225] Camundongos (n=15) foram alimentados com uma dieta rica em gordura suplementada com OCA com uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia e fenofibrato com uma dose de 40 mg/kg uma vez por dia desde a semana 16 até à 24.

**Grupo 8: Grupo de controle de ração**

[00226] Camundongos (n=8) foram alimentados com ração desde a semana 0 à 24.

**Plano do Estudo**

[00227] Os camundongos foram alimentados com uma dieta de ração rica em gordura (HFC) durante 14 semanas. Após 15 semanas na dieta HFC, os camundongos HFC foram emparelhados em 7 grupos com base na idade, peso corporal, colesterol plasmático e triglicerídeos após jejum de 4 horas. Os camundongos foram tratados com OCA e fenofibrato, isoladamente ou em combinação começando na semana 15 e sacrificados na semana 25 sem estarem em jejum. Uma semana antes do sacrifício, os camundongos foram marcados com D<sub>2</sub>O, por injeção i.p. de um bolo de D<sub>2</sub>O e subsequente adição de 4% de D<sub>2</sub>O à água potável. Plasma (EDTA) foi obtido por punção no coração e armazenado a -70 °C. O fígado foi pesado e foram isoladas 4 partes do fígado: 1 parte (lobo médio) foi fixada em 10% de formalina (para histologia de

NASH e fibrose) e 3 partes (lobo esquerdo) foram submetidas a congelamento rápida em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas individualmente a -70°C.

#### Classificação de inflamação hepática

[00228] A inflamação é uma característica-chave de NASH. A inflamação foi categorizada de acordo com o procedimento de Liang et al, PlosOne 2014 dezembro, 9(12) e classificado analisando quantitativamente o número de agregados de células inflamatórias. Em particular, o nível de inflamação foi avaliado pela contagem do número de focos inflamatórios por campo usando uma ampliação de 100 x (tamanho de visão de 3.1 mm<sup>2</sup>; média de cinco diferentes campos).

#### Resultados: Resumo dos efeitos de OCA + /- fenofibrato na inflamação em camundongos APOE\*3-Leiden.CETP

[00229] Os efeitos de OCA 10 mg/kg foram investigados isoladamente e em combinação com fenofibrato (10 e 40 mg/kg) na inflamação em camundongos APOE\*3-Leiden.CETP com uma dieta NASH. Após 10 semanas de administração de fármaco com dose baixa, nem OCA (10 mg/kg) nem o fenofibrato (10 mg/kg) reduziram o número de focos de células inflamatórias (Figuras 3A e 3B e Tabela 2). Por outro lado, a combinação diminuiu significativamente a inflamação em relação ao controle do veículo, bem como cada braço de monoterapia. Uma dose maior de fenofibrato (40 mg/kg/d) também reduz significativamente a inflamação em relação a controles do veículo. Quando combinado com OCA, não foram visíveis efeitos anti-inflamatórios adicionais com a dose elevada de fenofibrato a exercer um efeito quase máximo por si só. Em resumo, foi observada uma redução significativa na inflamação com a combinação de OCA + fenofibrato de baixa dose (-63%). Além disso, foram observadas uma redução significativa com a dose elevada de fenofibrato (-74%) e uma redução semelhante em combinação com OCA (-79%). Ver Tabela 2 e Figuras 3A e 3B.

**TABELA 2**

<b>Grupo</b>	<b>Inflamação (# de foco de células inflamatórias)</b>
Grupo 1: Grupo de referência HFC	24,3 ± 17,3
Grupo 2: Grupo de controle HFC	27,5 ± 18,0 (n=15)
Grupo 3: OCA	29,1 ± 22,7
Grupo 4: fenofibrato em dose baixa	22,0 ± 15,6
Grupo 5: fenofibrato em dose elevada	7,1 ± 5,9
Grupo 6: OCA + fenofibrato em dose baixa	10,0 ± 7,0
Grupo 7: OCA + fenofibrato em dose elevada	5,1 ± 7,0
Grupo 8: Controle de ração	0,8 ± 0,4

[00230] Os resultados na Tabela 2 sugerem que é promovida a eficácia da combinação de OCA e a dose elevada de fenofibrato, atingindo um limite superior com a dose elevada de fenofibrato.

#### *Isolamento e sequenciamento de RNA*

[00231] Foi realizada extração de ácidos nucleicos conforme descrito anteriormente em detalhe (Verschuren et al., 2014). Brevemente, o RNA total foi extraído de amostras de fígado individuais usando esferas de vidro e RNazol (Campro Scientific, Veenendaal, Países Baixos). A concentração e qualidade do RNA foi determinada usando o Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, E.U.A.) e o kit RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip e um Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Baixos). Todas as amostras preenchem os requisitos de qualidade e foram utilizadas no processo de sequenciamento de RNA.

[00232] Para processar as amostras foi usado NEBNext Ultra Directional RNA library Prep Kit for Illumina. A preparação das amostras

foi realizada de acordo com o protocolo "NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina" (NEB#E7420S/L). Brevemente, mRNA foi isolado a partir do RNA total usando grânulos magnéticos oligo-dT. Após a fragmentação do mRNA, realizou-se uma síntese do cDNA. Isto foi usado para ligação dos adaptadores de sequenciamento e amplificação PCR do produto resultante. A qualidade e rendimento após a preparação das amostras foi medida com o Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, E.U.A.). O tamanho dos produtos resultantes foi consistente com a distribuição de tamanho esperada (um pico amplo entre 300 e 500 bp).

[00233] A aglomeração e sequenciamento de DNA usando o Illumina NextSeq 2500 foi realizada de acordo com os protocolos do fabricante. Foram gerados dados usando protocolo de sequenciamento de leitura de extremidade simples obtendo aproximadamente 15 milhões de leituras por amostra e 75bp por leitura. Foi realizada análise de imagem, geração de bases (base calling) e verificação de qualidade com a análise de dados Illumina pipeline RTA v2.4.11 para gerar os dados não trabalhados (\*.fastq-files).

[00234] As leituras foram mapeadas para a sequência de referência *Mus musculus GRCm38.p3* usando um alinhador de leitura curta baseado em Burrows-Wheeler Transform. Foi usada a taxa de não correspondência por defeito de 2% (3 não correspondências em uma leitura de 150 bases). Com base nos locais de leitura mapeados nos arquivos de alinhamento (\*.bam-files), determinou-se a frequência de quantas vezes uma leitura foi mapeada em um transcrito. As contagens foram guardadas em arquivos de contagem (count-files), que serviram como entrada para análise de expressão diferencial a jusante de mRNA-seq. As contagens de leitura foram carregadas para o pacote DESeq, um pacote estatístico dentro da plataforma R. DESeq foi desenvolvido especificamente para normalizar dados de RNA-seq para diferentes



amostras e encontrar genes diferencialmente expressados entre duas condições para dados de RNA-seq para estimar a relação entre a média e a variância de cada gene (Anders et al., 2013). Além disso, permite que fatores de escala sejam facilmente incluídos no teste estatístico. Genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando um limiar de significância de  $P < 0,01$  e foram usados genes como entrada para análise de via através do programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (acessado em 2016).

[00235] Foi realizada análise de regulador a montante utilizando o software IPA (Kramer et al., 2014). Esta análise determina o estado de ativação de fatores de transcrição com base na expressão de gene diferencial observada. Isso resulta em um valor P de sobreposição e ativação z-score para cada fator de transcrição da base de conhecimento IPA. O valor P de sobreposição indica a importância da sobreposição entre os genes alvo conhecidos de um fator de transcrição e os genes diferencialmente expressos medidos em um experimento. A classificação z de ativação indica ativação (classificação z positiva) ou inibição (classificação z negativa) de um fator de transcrição particular. Uma classificação z de ativação  $< -2$  ou  $> 2$  indica inibição significativa ou ativação de uma via ou processo.

### Resultados ômicos

[00236] Foi realizado Next Generation Sequencing em amostras de mRNA de fígado de camundongos tratados para perceber melhor os mecanismos e vias subjacentes. Foram realizadas duas análises para perceber melhor os mecanismos e vias subjacentes.

[00237] Em primeiro lugar, uma análise de enriquecimento da análise de via canônica revelou que OCA regulava vários processos inflamatórios (Figura 6A). A figura representa em gráfico cada via como uma função de valor p -log (como referência, um valor transformado para  $p < 0,05$  é 1,3,  $p < 0,0001$  é 4, para  $p < 0,000005$  é 5,3, etc.). As vias

reguladas com monoterapia OCA foram relacionadas a assinatura de células T e B, sinalização de extravasamento de leucócitos, sinalização de célula assassina natural, etc. A baixa dose de fenofibrato não teve efeito sobre estas vias. Quando OCA foi combinada com a baixa dose de fenofibrato, algumas das mesmas vias foram fortemente reguladas (no caso de sinalização iCOS-iCOSL em células T adjuvantes, sinalização de extravasamento de leucócitos, receptores de reconhecimento de padrão, fagocitose mediada por receptores FC em macrófagos e formação de fagossomo). Além disso, outras vias (por exemplo, a biossíntese de colesterol I e II,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos) que não foram significativamente reguladas por qualquer dos agentes isoladamente, foram reguladas pela combinação (Figura 6B). Tal como com os dados histológicos, a dose elevada de fenofibrato teve um efeito robusto sobre estas vias, mas não foi reforçada com a co-administração de OCA.

[00238] Foi realizada uma análise mais detalhada em torno das vias envolvidas na sinalização de extravasamento de leucócitos. O extravasamento de leucócitos é essencial para processos fisiopatológicos em NASH (e outras doenças). Estes processos incluem a migração de linfócitos-T para imunovigilância, recrutamento de linfócitos e granulócitos ativados durante respostas inflamatórias agudas e crônicas e *homing* e mobilização de células progenitoras hematopoiéticas. Os efeitos da manutenção de camundongos em uma dieta rica em gordura do estudo ilustra estes processos em que regulou significativamente genes para cima e para baixo. A Tabela 3 descreve os efeitos de uma dieta rica em gordura na sinalização de extravasamento de leucócitos em camundongos mantidos em uma dieta rica em gorduras em relação a camundongos mantidos com uma ração padrão e também os efeitos do tratamento de combinação em relação à dieta rica em gordura.

TABELA 3.

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Significativamente regulado pela dieta NASH vs Ração	Significativamente regulado pelo Combo vs. DIETA NASH
CD43	Aglomerção de diferenciação 43 ou leucosialina	Sialoglicoproteína significativa localizada na superfície de linfócitos, monócitos, granulócitos T e alguns linfócitos B.	↑	↓
CD44	Aglomerção de diferenciação 44	Glicoproteína de superfície celular envolvida em interações célula-célula, adesão e migração celular	↑	↓
CDH5	Caderina 5 ou CD144	Transmite às células a capacidade de aderir de forma hemofílica e controla a coesão e organização de junções intercelulares	↑	↔
CRK	Regulador CT10 de quinase ou p38	Proteína adaptadora em vias de sinalização intracelulares	↓	↔
CXCR4	Receptor de Quimioquina de Motivo C-X-C 4 ou CD184	Receptor de atividade quimiotáctica para linfócitos	↑	↓
ERM	Família de proteínas exrina, radixina, moesina	Cruza filamentos de actina com membranas de plasma	↓	↓
EPAC	Proteína de troca ativada por cAMP	Sensores intracelulares para cAMP	↓	↔
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1 ou CD54	Glicoproteína de superfície celular que vincula integrinas	↑	↓
ITGA4	Subunidade da integrina alfa	Grande subunidade do receptor <i>homing</i> do linfócito α4β1	↑	↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Significativamente regulado pela dieta NASH vs Ração	Significativamente regulado pelo Combo vs. DIETA NASH
ITGAL	Integrina alfa L ou CD11A	Adesão celular e sinalização co-estimulatória	↑	↓
ITGAM	Integrina alfa M ou CD11B	Regula a adesão e migração de leucócitos	↑	↓
ITGB1	Integrina Beta-1 ou CD29	As integrinas participam na sinalização mediada por adesão celular e por superfície celular	↓	↔
ITGB2	Integrina Beta-2 ou CD18	As integrinas participam na sinalização mediada por adesão celular e por superfície celular	↑	↓
JAM2	Molécula de adesão de junção 2 ou CD322	Ligando adesivo para interagir com vários tipos de células imunes e <i>homing</i> de linfócitos	↑	↔
JAM3	Molécula de adesão de junção 3	Vincula-se a JAM2 na regulação da adesão	↓	↔
LFA-1	Antígeno Associado à Função Linfocitária 1	Molécula de adesão em células T, células B, macrófagos e neutrófilos	↔	↓
NCF1	Fator citosólico de neutrófilos 1	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos	↑	↓
NCF2	Fator citosólico de neutrófilos 2	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos	↑	↓
NCF4	Fator citosólico de neutrófilos 4	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos	↑	↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Significativa mente regulado pela dieta NASH vs Ração	Significativa mente regulado pelo Combo vs. DIETA NASH
NOX	Oxidase NADPH	Enzimas que transportam elétrons através da membrana do plasma e geram superóxidos e espécies de oxigênio reativas a jusante	↑	↓
PECAM1	Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas ou CD31	Transmigração de leucócitos, angiogênese e ativação de integrina	↑	↔
PKC	Proteína Quinase C	Parte da família de enzimas que controlam a fosforilação dos aminoácidos serina e treonina em outras proteínas	↔	↔
PI3K	Quinases PI3	PI3Ks são uma família de enzimas relacionadas do transdutor de sinal intracelular	↔	↓
PLC	Fosfolipase C	catalisa a formação de inositol 1, 4,5-trifosfato e diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	↔	↓
PSGL-1	Ligando da glicoproteína P-selectina 1	Tem um papel no tráfego de leucócitos durante a inflamação por fixação de leucócitos a plaquetas ativadas ou selectinas endoteliais	↑	↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Significativamente regulado pela dieta NASH vs Ração	Significativamente regulado pelo Combo vs. DIETA NASH
Rac2	Substrato de toxina botulínica com C3 relacionado com Ras	Regula diversos eventos celulares, incluindo o crescimento, a reorganização do citoesqueleto e a ativação de proteínas quinase	↑	↓
RASGRP1	Proteína liberadora de nucleotídeo guanil RAS	Ativa a cascata de quinase Erk/MAP e regula o desenvolvimento, homeostase e diferenciação de células T e B	↑	↓
RhoH	Gene H homólogo de RAS	Regula dinâmicas de actina intracelulares	↑	↓
RhoGAP	RHO GTPases	Domínio de proteína de proteínas de ativação GTPase	↔	↓
SPA-1	Proteína associada a proliferação induzida por sinal 1	Pode dificultar a progressão do ciclo celular induzido por mitógeno quando anormalmente expressa	↑	↔
THY-1	Antígeno de diferenciação de timócitos 1 ou CD90	Interações célula-célula e célula-matriz podem afetar o crescimento de neurites, regeneração nervosa, apoptose, metástase, inflamação e fibrose	↑	↓
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase	Liga e desativa metaloproteinases teciduais	↔	↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Significativa- mente regulado pela dieta NASH vs Ração	Significativa- mente regulado pelo Combo vs. DIETA NASH
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	Envolvida em vias de sinalização intracelulares que regulam as interações de matriz extracelular- integrina	↑	↓
VAV	VAV	Um proto-oncogene mediando ativação induzida por antígeno de linfócitos B	↑	↓
VCAM1	Proteína de adesão celular vascular 1 ou CD 106	Adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular	↑	↓
WASP	Síndrome de Wiskott- Aldrich)	Importante na motilidade dos leucócitos <i>in vivo</i>	↔	↓

[00239] A transmigração e extravasamento de leucócitos através do endotélio ocorre em várias etapas distintas incluindo rolamento dos leucócitos sobre as células endoteliais, mediado por interações transientes fracas entre moléculas de adesão. Subsequentemente, leucócitos frouxamente ligados ficam tão próximos do endotélio que são ativados por citocinas quimiotáticas, apresentadas na superfície apical do endotélio. A seguir, leucócitos ativados espalham-se e aderem firmemente ao endotélio formando estruturas de encaixe e finalmente migram pelas fendas intercelulares entre as células endoteliais para o tecido subjacente.

[00240] A administração de OCA regula para baixo vários genes envolvidos neste processo da cascata inflamatória dentro do leucócito (WAP, Rac2, RASGRP1, Vav, PKC, PI3K, ERM, ITGAL e PSGL-1) bem como dentro de células endoteliais (VCAM1, PI3K, ERM, NOX, CYBA,

PKC, NCF1 e 2). A regulação de gene dentro destas vias não foi evidente após administração de uma dose baixa de fenofibrato isoladamente.

[00241] Quando OCA foi combinado com uma dose de fenofibrato que foi ineficaz em regular estas vias, múltiplos genes adicionais foram então regulados, apontando para um efeito sinérgico. Dentro dos leucócitos, estes genes adicionais incluíam CD43, PSGL-1, CXCR4, ITGAM, ITGB2, Rap1, ITGA4. Dentro das células endoteliais, estes genes adicionais incluíam ICAM1, RhoGAP, VASP, NCF4, ITGAM, ITGB2, ITGA4 e ICAM-1.

[00242] Como referido acima, a dose elevada de fenofibrato teve vários efeitos sobre esta via que não foram reforçados com a co-administração de OCA. Todas as análises subsequentes focaram-se em monoterapias de dose baixa e combinação (OCA 10 mg/kg +/- fenofibrato 10 mg/kg).

[00243] Em uma segunda análise, foram comparados os genes diferencialmente regulados entre a combinação de baixa dose e cada respectiva monoterapia. Isto difere das primeiras análises de expressão de gene (descritas acima) que incidiram sobre as comparações em relação ao grupo de veículo; a análise abaixo compara cada monoterapia com a combinação. O diagrama de Venn (Figura 7A) mostra que OCA tem 109 genes exclusivamente regulados, fenofibrato tem 92 genes exclusivamente regulados e 6 genes comumente regulados. A combinação regulou 517 genes sobrepostos com OCA, 75 com fenofibrato e 5 genes eram comuns a todos. Assinale-se que a combinação regulava um total de 912 genes únicos. Um subsequente enriquecimento de via destaca os processos biológicos em que os genes de combinação estão envolvidos (Figura 7B).

[00244] Realizaram-se subsequentes análises de via tanto para extravasamento de leucócitos (por exemplo, como acima, mas desta



vez as comparações são entre a combinação e cada monoterapia). Para extravasamento de leucócitos, as comparações da combinação contra cada monoterapia revelaram que havia vários genes regulados exclusivamente consistentes com as mudanças anti-inflamatórias reforçadas observadas notadas histologicamente nos camundongos tratados com combinação (Tabela 4).

**TABELA 4.**

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Combinação vs Monoterapia de Fenofibrato	Combinação vs Monoterapia OCA
CD44	Aglomerção de diferenciação 44	Glicoproteína de superfície celular envolvida em interações célula-célula, adesão e migração celular		↓
CXCR4	Receptor de Quimioquina de Motivo C-X-C 4 ou CD184	Receptor de atividade quimiotática para linfócitos		↓
CYBA1	Citocromo b(-245)	Codifica uma cadeia leve de citocromo b(-245), que é um componente do complexo NOX		↓
ERM	Família de proteínas exrina, radixina, moesina	Cruza filamentos de actina com membranas de plasma		↓
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1 ou CD54	Glicoproteína de superfície celular que vincula integrinas	↓	↓
ITGA4	Subunidade da integrina alfa	Grande subunidade do receptor <i>homing</i> do linfócito α4β1	↓	↓
ITGAL	Integrina alfa L ou CD11A	Adesão celular e sinalização co-estimulatória		↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Combinação vs Monoterapia de Fenofibrato	Combinação vs Monoterapia OCA
ITGAM	Integrina alfa M ou CD11B	Regula a adesão e migração de leucócitos		↓
ITGB2	Integrina Beta-2 ou CD18	As integrinas participam na sinalização mediada por adesão celular e por superfície celular	↓	↓
LFA-1	Antígeno Associado à Função Linfocitária 1	Molécula de adesão em células T, células B, macrófagos e neutrófilos	↓	↓
MMP9	Matriz de metaloprotease 9	Degrada o colágeno da matriz extracelular		↓
NCF1	Fator citosólico de neutrófilos 1	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos		↓
NCF2	Fator citosólico de neutrófilos 2	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos		↓
NCF4	Fator citosólico de neutrófilos 4	Uma subunidade da oxidase NADPH de neutrófilos		↓
NOX	Oxidase NADPH	Enzimas que transportam elétrons através da membrana do plasma e geram superóxidos e espécies de oxigênio reativas a jusante		↓
PKC	Proteína Quinase C	Parte da família de enzimas que controlam a fosforilação dos aminoácidos serina e treonina em outras proteínas		↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Combinação vs Monoterapia de Fenofibrato	Combinação vs Monoterapia OCA
PI3K	Quinases PI3	PI3Ks são uma família de enzimas relacionadas do transdutor de sinal intracelular	↓	↓
PLC $\gamma$	Fosfolipase C	catalisa a formação de inositol 1, 4,5-trifosfato e diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato		↓
PSGL-1	Ligando da glicoproteína P-selectina 1	Tem um papel no tráfego de leucócitos durante a inflamação por fixação de leucócitos a plaquetas ativadas ou selectinas endoteliais	↓	↓
Rac2	Substrato de toxina botulínica com C3 relacionado com Ras	Regula diversos eventos celulares, incluindo o crescimento, a reorganização do citoesqueleto e a ativação de proteínas quinase		↓
Rap1GAP	Proteína Ativadora de GTPase 1 RAP1	RAP1 é de particular interesse, uma vez que foi demonstrado ser um antagonista de RAS e ser capaz de suprimir a transformação celular		↓
RASGRP1	Proteína liberadora de nucleotídeo guanil RAS	Ativa a cascata de quinase Erk/MAP e regula o desenvolvimento, homeostase e diferenciação de células T e B		↓

Gene	Nome(s) completo(s)	Função prevista	Combinação vs Monoterapia de Fenofibrato	Combinação vs Monoterapia OCA
RhoH	Gene H homólogo de RAS	Regula dinâmicas de actina intracelulares		↓
RhoGAP	RHO GTPases	Domínio de proteína de proteínas de ativação GTPase		↓
TIMP	Inibidor tecidual da metaloproteinase	Liga e desativa metaloproteinases teciduais		↓
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	Envolvida em vias de sinalização intracelulares que regulam as interações de matriz extracelular-integrina		↓
VAV	VAV	Um proto-oncogene mediando ativação induzida por antígeno de linfócitos B		↓
VCAM1	Proteína de adesão celular vascular 1 ou CD 106	Adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular		↓
WASP	Síndrome de Wiskott-Aldrich)	Importante na motilidade dos leucócitos <i>in vivo</i>		↓

[00245] Dada a progressão da inflamação para fibrose em NASH e a observação de que vias de fibrose hepática/HSC emergiram como significativamente reguladas na combinação, examinamos também vias em HSCs. Quando comparado com a monoterapia, é claro que mais genes são regulados na combinação versus fenofibrato isolado e menos genes são regulados na combinação versus OCA. Por outras palavras, no que diz respeito a estas vias fibróticas, há claramente uma interação entre ambos os agentes, mas a porção de OCA da combinação pode estar a potenciar estes efeitos mais fortemente.

### Interpretação e relevância

[00246] A importância da ativação FXR na prevenção de fibrose e inflamação é demonstrada em fígados de camundongos com gene inativado FXR que exibem elevada expressão de genes inflamatórios (Kim 2007) com progressivas lesões e inflamação relacionadas com o envelhecimento (Yang 2007). Consistentemente com estes relatórios, OCA exerceu propriedades anti-inflamatórias em células HepG2 e hepatócitos primários de camundongo. Células HepG2 pré-tratadas com OCA e depois expostas a estímulos pro-inflamatórios exibiram uma redução de 50% a 60% nos níveis de TNF- $\alpha$  mRNA, indução de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e expressão de sintase de óxido nítrico induzível estimulada por TNF- $\alpha$  (iNOS). Igualmente, hepatócitos primários tratados com OCA exibiram uma indução reduzida (de 40% a 50%) de iNOS e expressão de gene de proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) em resposta a estímulos pró-inflamatórios (Wang 2008). Os efeitos de OCA nos mecanismos de migração celular ainda não foram estudados diretamente, contudo OCA inibiu a produção de iNOS ou COX-2 induzido por IL-1 $\beta$  e aboliu a migração de células musculares lisas aórticas de camundongos induzidos farmacologicamente (Li 2007). Demonstrou-se semelhante inibição de infiltrados inflamatórios com OCA no tecido intestinal de dois modelos animais de doença inflamatória intestinal (DSS e ácido sulfônico trinitrobenzeno) (Gadaleta 2011) e no rim de um modelo de camundongo de diabetes tipo 1 (Wang 2010). Assim, a observação de efeitos anti-inflamatórios reforçados por OCA sugere que mudanças na expressão gênica com OCA em combinação com fenofibrato podem aumentar a inibição da inflamação e migração de células inflamatórias em várias condições de doença.

### **Exemplo 3: NASH induzido por dieta em camundongos ob/ob deficientes em leptina**

[00247] Este experimento foi realizado para avaliar o efeito de oito

semanas de tratamento com OCA e atorvastatina isoladamente e em combinação na fase de fibrose (pré-biópsia vs pós-biópsia) em camundongos macho ob/ob-NASH deficientes em leptina

#### Animais, alojamento e dieta

[00248] Camundongos macho *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* (com 5 semanas de idade) foram adquiridos à JanVier, França. Durante o período de aclimatização e indução de dieta, os camundongos foram agrupados em grupos de cinco por gaiola em armários feitos à medida sob um ciclo de luz/escuro 12:12 (luzes acesas das 3AM-3PM) em condições de temperatura controlada ( $22 \pm 1$  ° C;  $50 \pm 10\%$  de umidade relativa). Ao longo da indução da dieta e período de estudo, os camundongos tiveram acesso *ad libitum* a uma dieta NASH feita à medida (S8189, Ssniff, Alemanha) (40% de gordura, 40% de carboidratos (20% de frutose) e 2% de colesterol) ou ração de roedores normal (ração ob/ob) (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca), e água da torneira. Os animais foram mantidos em dieta por um total de 18 semanas antes da intervenção e mantidos na dieta ao longo do período de estudo. Os animais foram alojados individualmente durante a recuperação pós-operatória e durante todo o período de estudo.

#### Grupos de tratamento

##### **Grupo 1: *LEP<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* - veículo NASH**

[00249] A camundongos (n=10) foi administrado oralmente um veículo (0,5% de CMC), em um volume de 5 mL/kg, uma vez por dia, desde a semana 0 até à 8.

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

[00250] A camundongos (n=10) foi administrado oralmente veículo suplementado com OCA, com uma dose de 30 mg/kg, uma vez por dia, desde a semana 0 até à 8.

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

[00251] A camundongos (n=11) foi administrado oralmente veículo

suplementado com atorvastatina com uma dose de 10 mg/kg, uma vez por dia, desde a semana 0 até à 8.

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

[00252] A camundongos (n=9) foi administrado oralmente veículo suplementado com uma combinação de OCA, com uma dose de 30 mg/kg, e atorvastatina, com uma dose de 30 mg/kg, uma vez ao dia.

*Alocação em estudos, randomização estratificada e monitoramento de linha de base*

[00253] Após 15 semanas de indução da dieta (3 semanas antes do início do estudo), uma biópsia do fígado foi obtida para avaliação da progressão hepática da fibrose e esteatose hepática e para avaliação da fase de fibrose hepática. Na semana -1, realizou-se uma randomização estratificada em grupos de tratamento de acordo com a fase de fibrose hepática, classificação de esteatose e peso corporal.

*Procedimento de pré-biopsia*

[00254] No dia da operação, camundongos foram anestesiados com isoflurano (2-3%) em 100% de oxigênio. Foi feita uma pequena incisão abdominal na linha média e foi exposto o lobo lateral esquerdo do fígado. Uma cunha em forma de cone de tecido do fígado (~ 100 mg) foi excisada da porção distal do lobo, pesada e fixada em 4% de paraformaldeído (PFA) para histologia. A superfície de corte do fígado foi instantaneamente eletrocoagulada usando coagulação bipolar (unidade eletrocirúrgica ERBE VIO 100). O fígado foi devolvido à cavidade abdominal, a parede abdominal foi suturada e a pele fechada com grampeadores. No dia da operação, os camundongos receberam solução salina aquecida (0,5 ml) para reidratação. Para recuperação pós-operação, carprofeno (5mg/ml – 0,01 ml/10g) e enrofloxazina (5mg/ml – 1 ml/kg) foram administrados subcutaneamente no dia da operação e nos dias de pós-operação 1 e 2.

*Pré-triagem para avaliação do nível hepático de esteatose e fibrose*

[00255] Preparação de biópsia do fígado para avaliação histológica: Após armazenamento de um dia para o outro em PFA a 4%, biópsias de fígado foram infiltradas de um dia para o outro em parafina em um Miles Scientific Tissue-TEK VIP Tissue Processor e posteriormente embebidas em blocos de parafina. Biópsias de cinco diferentes animais foram embebidas em um bloco. Os blocos foram então aparados e foram cortadas duas secções de 3 µm (uma para Sirius Red e outra para coloração H&E) em um Microm HM340E Microtome (Thermo Scientific). Dois blocos foram colocados em uma lâmina, dando um total de 10 biópsias por lâmina representando 10 animais diferentes. As secções foram deixadas a secar durante a noite. Foi realizada avaliação da fase de fibrose para estratificação e randomização em grupos de tratamento conforme descrito por Kleiner et al. (2005) (ver abaixo).

#### *Linha de base e biomarcadores de plasma final*

[00256] Amostras de sangue para medição de níveis de plasma não-jejum (alimentado) de triglicerídeos foram obtidas pela manhã (07:00-08:00) na linha de base e na semana 8 de tratamento. As amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda (por recorte) em um estado consciente. A última dose de fármaco foi administrada ~18 horas antes da recolha de amostras de sangue. Os camundongos foram re-alimentados após a recolha de amostras de sangue.

#### *Eliminação e necropsia*

[00257] Os animais foram eliminados na semana 8 em um estado não-jejum. A última dose de fármaco foi administrada ~18 horas antes da eliminação e os animais não receberão dosagem de fármaco antes da eliminação. Os animais foram induzidos por CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> e durante a anestesia (isoflurano), a cavidade abdominal é aberta e é obtido sangue cardíaco para coleta de plasma terminal. Após a necropsia, todo o fígado foi coletado e pesado. Uma biópsia do lobo lateral esquerdo foi excisada e fixada em PFA a 4% para histologia e análise bioquímica. O



lobo médio foi dividido em pedaços e rapidamente congelado em nitrogênio líquido para análise bioquímica (TG). O restante tecido de fígado foi posteriormente fixado em PFA a 4% para posterior histologia opcional.

#### Processamento de tecido do fígado

[00258] Biopsia pré-estudo: Aproximadamente três semanas antes do início do estudo, uma cunha em forma de cone de tecido do fígado (~100 mg) foi excisada da porção distal do lobo lateral esquerdo, pesada e imediatamente colocada em PFA a 4%.

[00259] Tecido de fígado terminal: Após 8 semanas de tratamento, o fígado inteiro foi coletado, pesado e foi excisada uma biópsia do fígado do lobo lateral esquerdo e imediatamente colocada em PFA a 4% (~150-200 mg). Pedaços de lobo médio serão congelados rapidamente em criotubos (RNAseq)(~100 mg) e em tubos FastPrep para TG (~100 mg) e para TC (~50 mg).

[00260] Fixação, incorporação e secções para histologia: Após fixação de um dia para o outro em PFA a 4%, biópsias de fígado foram infiltradas de um dia para o outro em parafina em um Miles Scientific Tissue-TEK VIP Tissue Processor e posteriormente embebidas em blocos de parafina. Biópsias de cinco diferentes animais foram embebidas em um bloco. Os blocos foram aparados e foram cortadas duas secções de 3 µm por bloco em um Microm HM340E Microtome (Thermo Scientific). Uma secção de dois blocos diferentes foi colocada em uma lâmina de objeto, dando um total de 10 biópsias por lâmina como acima descrito.

#### Fase de fibrose

[00261] Tecido de fígado pré-biópsia e pós-biópsia do lobo lateral esquerdo foi coletado para avaliação da fase de fibrose pela utilização de critérios clínicos descritos por Kleiner e colegas (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, Kleiner

et al, Hepatology 41; 2005) e reproduzidos na Tabela 5 abaixo. A Figura 4 descreve o efeito OCA e atorvastatina isoladamente e em combinação na classificação da fibrose. A combinação de OCA e atorvastatina mostra uma tendência em baixar a classificação da fibrose, embora não de uma maneira significativa, do veículo (valor  $p = 0,09$ ).

**TABELA 5**

Característica	Grau	Classificação
Fibrose	Nenhum	0
	Perissinusoidal ou periportal	1
	Ligeiro, zona 3, perissinusoidal	1A
	Moderado, zona 3, perissinusoidal	1B
	Portal/periportal	1C
	Perissinusoidal & portal/periportal	2
	Ponte de fibrose	3
	Nenhum	0

**Triglicerídeos plasmáticos**

[00262] Níveis de triglicerídeos: 100 µl de sangue são recolhidos em tubos de lítio-heparina. Foi separado plasma e as amostras foram armazenadas a -80 graus Celsius até à análise. Os níveis de triglicerídeos foram medidos em determinações únicas usando um auto-analisador Cobas C-111 com kit comercial (Roche Diagnostics, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Como indicado nas Figuras 5A e 5B, a combinação de OCA e atorvastatina reduziu os níveis de triglicerídeos de uma maneira estatisticamente significativa.

**Exemplo 4: Cultura sanduíche de hepatócitos**

[00263] Este experimento será realizado para avaliar o efeito de OCA, em combinação com um agonista PPAR ou estatina, para determinar a sua capacidade de alterar a síntese de colágeno em hepatócitos humanos.

### Reagentes e Soluções

[00264] Meio de cultura de células adequado inclui MB-752/1 da Waymouth, F12 de Ham, RPMI 1640, meio de Eagle modificado por Dulbecco, meio E de William, L15 de Leibovitz e meio de Chee modificado. Colagenase tipo IV, colágeno tipo I, Percoll, meio de cultura e suplementos são adicionados ao meio de cultura (por exemplo, soro, antibióticos, aminoácidos, hormonas, tais como DEX, insulina e fatores de crescimento), tampão de perfusão, e outras soluções estavam disponíveis comercialmente ou foram feitas a partir de materiais disponíveis comercialmente. Outros tipos de colágeno (tipo II-IV), laminina, fibronectina e proteoglicanos de sulfato de heparina podem ser utilizados na cultura sanduíche de hepatócitos. No entanto, foi demonstrado que os colágenos tipo I e IV foram superiores a fibronectina e laminina.

### Isolamento de hepatócitos

[00265] Será usado um método de perfusão com colagenase *in situ* para isolar os hepatócitos. Resumidamente, os hepatócitos serão isolados a partir de ratos Lewis fêmea. Os animais serão anestesiados. O fígado será primeiro perfundido através da veia porta *in situ* com um tampão de perfusão. O perfusato será equilibrado antes de entrar no fígado. O fígado será subsequentemente submetido a perfusão com colagenase em tampão de perfusão. O fígado será então dissecado e transferido para tampão de perfusão gelado. A cápsula do fígado irá ser estimulada à parte e a suspensão de células resultante será filtrada. O agregado celular será recolhido por centrifugação e ressuspenso. Será adicionado Percoll à suspensão e hepatócitos serão separados utilizando uma técnica de centrifugação de densidade de Percoll. A mistura será centrifugada e o agregado celular lavado duas vezes com meio. A viabilidade de hepatócitos será determinada por exclusão de azul de tripan. Em alternativa, podem ser usados hepatócitos criopreservados em vez de hepatócitos isolados de fresco.

### Cultura sanduíche de hepatócitos

[00266] Hepatócitos isolados serão cultivados em placas de cultura de tecido revestidas com colágeno e mantidos em meio de cultura suplementado com soro, penicilina, estreptomicina, fator de crescimento epidérmico, insulina, glucagon e hidrocortisona. Uma solução gelificante de colágeno será preparada por mistura de solução de colágeno do tipo I e meio de cultura. Placas de cultura de tecido serão revestidas com a solução gelificante e incubadas a 37 °C para promover a formação de gel. Hepatócitos serão semeados a uma densidade apropriada e mantidos a 37 °C. O meio de cultura será substituído a cada 24 horas.

[00267] Para o sistema de sanduíche, uma solução de gel de colágeno adicional será distribuída sobre as células após 1 dia de cultura. O meio de cultura será cuidadosamente removido para assegurar que a segunda camada de gel de colágeno é uniformemente distribuída ao longo de toda a placa. As placas de cultura serão incubadas a 37 °C para permitir a gelificação e fixação da segunda camada de gel antes de o meio ser substituído. O meio de cultura será mudado diariamente. Amostras do meio serão armazenadas a -20 °C para posterior análise.

[00268] Os hepatócitos cultivados entre as camadas de colágeno gelificado mantêm uma forma cúbica tridimensional e distribuição de proteínas do citoesqueleto semelhante ao observado *in vivo*.

### Optimização da formação da rede canalicular biliar

[00269] Para otimizar o acúmulo de taurocolato e excreção biliar, pode ser usado um meio de cultura em particular, tal como meio E de Williams e meio de Eagle modificado por Dulbecco na cultura sanduíche de hepatócitos.

### Artigos de teste

[00270] O agonista FXR destinado a estudo é o ácido obeticólico, também conhecido como "OCA" e ácido 6-etil quenodeoxicólico (6-ECDCA).

[00271] Agonistas PPAR-alfa destinados a estudo incluem um ou mais de clofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, bezafibrato e fenofibrato.

[00272] Um agonista dual PPAR-alfa/delta é ácido 2-[2,6- dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]-fenóxi]-2-metilpropanoico.

[00273] Um agonista PPAR $\delta$  (delta) destinado a estudo é GW501516.

[00274] Estatinas (inibidores da redutase HMG-CoA) destinadas a estudo incluem atorvastatina (Lipitor) e rosuvastatina (Crestor) e simvastatina (Zocor).

#### **Exemplo 5: Avaliar Efeitos da Administração Individual de Artigos de Teste em Perfis Lipídicos**

[00275] O potencial de 5 artigos de teste, um agonista FXR, um agonista PPAR-alfa, um agonista PPAR-delta, um agonista dual PPAR-alfa/delta (ou, alternativamente, agonista PPAR-alfa e agonista PPAR-delta em conjunto), e uma estatina será avaliado para determinar a capacidade de alterar a síntese de colesterol e o perfil lipídico em hepatócitos humanos. As alterações serão avaliadas em hepatócitos humanos cultivados em sanduíche (SCHH) após 72 horas de exposição a artigos de teste em 3 concentrações diferentes. As soluções de dosagem serão feitas diariamente em meios de cultura e a dosagem de SCHH ocorrerá diariamente por 3 dias. O experimento será realizado no formato de 24 poços usando um (1) lote de hepatócitos humanos Transporter Certified™ (N = 1). Cada condição de teste será realizada em três (3) poços para providenciar dados em triplicado (expressos como desvio padrão médio  $\pm$ ). Placas tratadas com controle de solvente serão usadas como controle e avaliadas quanto à função de linha de base. No final do período de teste, será adicionado padrão interno aos poços individuais, seguido da adição do reagente de extração para criação de perfil lipídico global. As amostras serão agitadas por 1 hora à temperatura ambiente e centrifugadas. O sobrenadante será

evaporado até à secura sob nitrogênio, ressuspenso e analisado.

[00276] A criação de perfil lipídico global será executada usando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) e MS de alta resolução. Extratos de amostra de metil-t-butila serão analisados em instrumentação UPLC-MS (Synapt G2 Ion-Mobility QToF), em ESI+ e ESI-modo, para cobrir uma vasta gama de polaridade e composição química de lipídios. Inicialmente, UPLC será usada para avaliar os efeitos dos compostos sobre uma ampla gama (5000 a 8000) de lipídios, incluindo vários ésteres de colesterol. Será realizada análise colorimétrica para medir o colesterol total. Com base na abundância a maior parte serão glicerofosfolipídios, no entanto, será avaliado um grande número de classes. Perfis serão avaliados para identificar potenciais efeitos sobre lipídios individuais. A identificação de lipídios específicos poderá ser executada de acordo com os padrões usando o tempo de retenção do ensaio, a massa exata e a fragmentação. Dependendo do resultado, lipídios ou classes de lipídios específicos podem ser identificados para avaliação nos Exemplos 6 e 7. Um estudo de confirmação será repetido em dois lotes adicionais de hepatócitos humanos Transporter Certified™ (N = 2).

#### **Exemplo 6: Avaliar Efeitos de Combinações Duais de Artigos de Teste em Perfis Lipídicos**

[00277] Combinações de agonista FXR, com cada um de um agonista PPAR-alfa, um agonista PPAR-delta, um agonista dual PPAR-alfa e delta (ou, em alternativa, um agonista FXR com um agonista PPAR-alfa e um agonista PPAR delta), e/ou uma estatina serão avaliadas quanto ao seu potencial para alterar a síntese de colesterol e o perfil lipídico em hepatócitos humanos. Combinações específicas avaliadas serão:

- Agonista FXR com agonista PPAR-alfa
- Agonista FXR com agonista PPAR-delta

- Agonista FXR com agonista dual PPAR-alfa e delta e/ou agonista FXR com agonista PPAR-alfa e agonista PPAR-delta

- Agonista FXR com uma estatina

[00278] As alterações serão avaliadas em hepatócitos humanos cultivados em sanduíche (SCHH) após 72 horas de exposição a artigos de teste em 3 concentrações diferentes. As soluções de dosagem serão feitas diariamente em meios de cultura e a dosagem de SCHH ocorrerá diariamente por 3 dias. O experimento será realizado no formato de 24 poços usando um (1) lote de hepatócitos humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condição de teste será realizada em três (3) poços para providenciar dados em triplicado (expressos como desvio padrão médio  $\pm$ ). As amostras serão preparadas e analisadas quanto a perfil lipídico global conforme detalhado no Exemplo 5. As alterações nos perfis lipídicos e síntese de colesterol serão comparadas com os efeitos da administração individual no Exemplo 2.

#### **Exemplo 7: Avaliar Efeitos de Combinações Triplas de Artigos de Teste em Perfis Lipídicos**

[00279] A combinação tripla de um agonista FXR, agonista PPAR-alfa, agonista PPAR-delta, agonista dual PPAR-alfa e delta (ou um agonista PPAR-alfa em combinação com um agonista PPAR delta), e/ou uma estatina será avaliada quanto ao potencial para alterar a síntese de colesterol e o perfil lipídico em hepatócitos humanos. As alterações serão avaliadas em hepatócitos humanos cultivados em sanduíche (SCHH) após 72 horas de exposição a artigos de teste em 3 concentrações diferentes. As soluções de dosagem serão feitas diariamente em meios de cultura e a dosagem de SCHH ocorrerá diariamente por 3 dias. O experimento será realizado no formato de 24 poços usando um (1) lote de hepatócitos humanos Transporter Certified™ (N = 1). Cada condição de teste será realizada em três (3) poços para providenciar dados em triplicado (expressos como desvio

padrão médio  $\pm$ ). As amostras serão preparadas e analisadas quanto a perfil lipídico global conforme detalhado no Exemplo 2. As alterações nos perfis lipídicos e síntese de colesterol serão comparadas com os efeitos de combinações administradas no Exemplo 2. Combinações específicas avaliadas serão:

- Agonista FXR com um agonista PPAR-alfa e uma estatina
- Agonista FXR com um agonista PPAR-delta e uma estatina
- Agonista FXR com um agonista dual PPAR-alfa e delta (ou, em alternativa, um agonista PPAR-alfa e um agonista PPAR-delta), e uma estatina

[00280] As amostras serão preparadas e analisadas quanto a perfil lipídico global conforme detalhado no Exemplo 4. As alterações nos perfis lipídicos e síntese de colesterol serão comparadas com os efeitos de combinações administradas nos Exemplos 4 e 5.

### **Exemplo 8: Estudos com animais**

#### Animais

[00281] Os animais serão alojados individualmente em gaiolas padrão a 22 °C em um ciclo luz-escuridão de 12h:12h. A camundongos macho C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) será permitido o acesso *ad libitum* a uma dieta enriquecida em termos de gorduras (40% de kcal, óleo vegetal parcialmente hidrogenado Primex), frutose (22% em peso), e colesterol (2% em peso) (Research Diets, New Brunswick, NJ, cat. no. D09100301). Uma dieta com baixo teor de gordura (10% de kcal; doravante referida como LFD) sem frutose ou colesterol será usada como uma dieta controle (Research Diets, cat. no. D09100304). O uso deste LFD validado estabelece um grupo de camundongos de controle que mantêm um fenótipo hepático "normal" para comparação com animais alimentados com a dieta experimental.

#### Grupos de tratamento

[00282] HFD de Controle:



- [00283] LFD de Controle:
- [00284] Agonista HFD +FXR:
- [00285] HFD + PPAR $\alpha$  (ou seja, fenofibrato, gemfibrozil, bezofibrato ou ciprofibrato):
- [00286] HFD + PPAR $\delta$  (ou seja, GW501516):
- [00287] HFD + PPAR $\alpha$  + PPAR $\delta$ :
- [00288] HFD + dual PPAR $\alpha/\delta$  (ou seja, GFT505):
- [00289] HFD + estatina (ou seja, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina)
- [00290] HFD +agonista FXR + PPAR $\alpha$ :
- [00291] HFD +agonista FXR + PPAR $\delta$ :
- [00292] HFD +agonista FXR + PPAR $\alpha$  + PPAR $\delta$ :
- [00293] HFD + agonista FXR + PPAR $\alpha/\delta$  dual:
- [00294] HFD + agonista FXR + estatina:

*Histologia e análise de imagem digital*

[00295] Na eliminação dos animais, os lobos médio direito e/ou lateral esquerdo do fígado ( $\geq 50\%$  de cada lobo coletado) serão excisados e fixados em 10% de formalina com tampão neutro (pelo menos 7 dias à temperatura ambiente). O tecido do fígado será cuidadosamente excisado para selecionar secções com tamanhos semelhantes representativas do centro e da borda do tecido. O tecido do fígado será embebido em parafina, seccionado (5  $\mu$ m) e montado. Será usada coloração de hematoxilina e eosina para análises morfológicas e será utilizada coloração tricromo de Masson e Sirius red para avaliação da fibrose hepática. A análise histopatológica será realizada por um patologista alheio ao estudo. NAFLD e NASH serão classificados usando critérios descritos por Kleiner e colegas. Para avaliação quantitativa da fibrose, serão varridas secções inteiras coradas de Sirius red, usando o sistema de varredura de lâmina total ScanScope CS (Aperio, Vista, CA) com x20 de ampliação. Imagens

serão extraídas e perfis de colágeno corados de Sirius red de tecidos inteiros serão medidos pelo método baseado em cubo de cor com o software Image-Pro Analyzer (MediaCybernetics v.6.2, Bethesda, MD). A coloração de colágeno total (reportada como % da área total) será avaliada a partir de três a quatro secções representativas de cada animal (exceto para o experimento de avaliação abrangente de fibrose hepática onde serão avaliadas secções adicionais). Todas as análises histológicas serão executadas por técnicos alheios ao estudo.

#### Biopsia do fígado

[00296] Os camundongos serão anestesiados com isoflurano (2–3%) em oxigênio a 100%. Será feita uma pequena incisão abdominal ~0.5 cm à esquerda da linha média e será exposto o lobo lateral esquerdo do fígado. Uma cunha de tecido do fígado (~ 50 mg) será excisada da porção distal do lobo, imediatamente colocada em um frasco e congelada rapidamente em nitrogênio líquido. Uma cunha de esponja de gelatina absorvível (GelFoam, Pfizer, NI) será inserida nas extremidades do corte do fígado. Uma vez atingida hemostasia (normalmente dentro de 1 min) e que a esponja de gelatina esteja bem fixa ao local da biópsia, o fígado será devolvido à cavidade abdominal, a parede abdominal será suturada e a pele grampeada. Os camundongos receberão uma única injeção de buprenorfina (0,05 mg/kg, subcutânea) no momento da cirurgia para controle da dor pós-operatória. Camundongos sham-operados passarão por um procedimento idêntico exceto sem incisão feita no fígado.

#### Análise de plasma e soro

[00297] Os níveis de glucose do plasma, triglicerídeos, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) serão medidos usando um Olympus AU400e Bioanalyzer (Olympus America Diagnostics, Center Valley, PA). Amostras de plasma serão diluídas 1:10 com PBS para medição de ALT e AST. A

adiponectina de plasma total e insulina sérica em jejum serão medidas de acordo com as instruções do fabricante com kits de eletroquimio-luminescência disponíveis comercialmente (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Quantificação do teor total de lipídios hepáticos e colágeno

[00298] Os lipídios hepáticos totais serão extraídos do fígado usando um protocolo adaptado de Folch *et al.* Tecido do fígado congelado (~0.3 g) será homogeneizado em 10 ml de solução de clorofórmio-metanol 2:1. O homogeneizado será filtrado usando papel de filtro sem gordura e canalizado para um frasco de vidro de 15 ml pré-pesado. Serão adicionados mais 5 ml de clorofórmio-metanol 2:1 seguido de 2,5 ml de NaCl a 0,9%. Os lipídios serão separados por centrifugação a 1.800 g, 10 °C durante 5 minutos, a camada aquosa será descartada e o tubo será purgado com nitrogênio até o granulado lipídico estar seco. O tubo contendo o granulado lipídico será novamente pesado e serão calculados os lipídios totais extraídos por grama de fígado total. O teor de colágeno total no fígado será medido por determinação colorimétrica de resíduos de hidroxiprolina por hidrólise ácida de colágeno (Quickzyme, Leiden, Países Baixos).

Determinação de proteína colágeno-1 $\alpha$ 1 extraível por mancha de proteína (protein blot)

[00299] Núcleos do tecido (50–100 mg) serão recolhidos do lobo lateral esquerdo do fígado, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até serem processados. O tecido será homogeneizado em tampão de lise contendo inibidores de protease. A concentração de proteínas do sobrenadante removido será medida com um kit de ensaio de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL). Lisados de tecido hepático (~50  $\mu$ g) serão separados em géis Nupage de redução 4–12% (Life Technologies, Carlsbad, CA) e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas serão cortadas entre os

marcadores 50 e 60-kDa e bloqueadas com 5% de Blotto. A metade superior será sondada com anti-colágeno-1 $\alpha$ 1 (1:1,000; cat. no. NBP1–30054; Novus Biologicals, Littleton, CO), que detecta a porção de telopeptídeo de terminal COOH da proteína de colágeno-1 $\alpha$ 1. Para normalização, a metade inferior será sondada com antigliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 1:7,500; cat. no. 3683; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Após incubação com anticorpos anti-coelho de peroxidase de rábano silvestre, a expressão da proteína será detectada com quimioluminescência reforçada (Thermo Scientific, Rockford, IL) e será executada densitometria com um FluorChem System (Cell Biosciences, Santa Clara, CA). A análise de densitometria de colágeno-1 $\alpha$ 1 irá incluir a proteína madura 140-kDa, bem como uma faixa um pouco maior, correspondente a uma forma glicosilada ou uma proteína de colágeno-1 $\alpha$ 1 parcialmente processada.

#### Alterações de expressão do gene hepático

[00300] Amostras de tecido do lobo lateral esquerdo do fígado serão colhidas com uma ferramenta de extração de tecidos de 6mm ou pelo método de biópsia, serão congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até serem processadas. O RNA total das amostras de fígado (~ 50-150 mg) será extraído usando Reagente TRI (Life Technologies) e em seguida adicionalmente purificado com um kit Qiagen RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). A integridade do RNA será determinada usando o nano kit Agilent 6000 em um Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). cDNA será preparado usando o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies). As alterações na expressão gênica serão confirmadas por ensaios a pedido da expressão gênica TaqMan e Universal Master Mix (Life Technologies) em um instrumento ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). A alteração na expressão gênica será

calculada pelo ciclo de limiar comparativo (CT) com peptidilprolil isomerase A (*Ppia*) e *Gapdh* para normalização. Para matrizes de gene, amostras de cDNA serão executadas em Mouse Fibrosis RT2 Profiler PCR Arrays (PAMM-120C, RT2 SYBR Green/ROX qPCR Master Mix; SABiosciences) usando ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Alterações na expressão gênica na matriz serão calculadas pelo método CT comparativo usando software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems/Life Technologies). Entre os cinco genes de manutenção incluídos em Mouse Fibrosis RT2 Profiler PCR Array, a hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*Hprt*) e *Gapdh* têm a expressão mais estável de acordo com as classificações de estabilidade calculadas pelo software DataAssist v3.0. A média dos genes de controle endógenos escolhidos será usada como o fator de normalização para calcular a expressão relativa de cada gene. Para confirmar os resultados obtidos por meio da matriz de fibrose, serão conduzidos ensaios de expressão gênica TaqMan para que uma seleção de genes determinada pela matriz seja regulada para cima, para baixo ou que se mantenha inalterada.

#### **Exemplo 9: Ensaio clínico**

[00301] Um ensaio clínico randomizado com grupo paralelo, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo foi realizado em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica não-cirrótica para avaliar o tratamento com ácido obeticolico, administrado por via oral (25 mg por dia) ou placebo durante 72 semanas. Os pacientes foram aleatoriamente atribuídos 1:1 usando um procedimento gerado por computador e administrado centralmente, estratificado por centro clínico e estado de diabetes. A medida de resultado primário foi a melhoria em histologia hepática classificada centralmente definida como uma diminuição na classificação de atividade de doença hepática gordurosa não alcoólica em pelo menos 2 pontos sem agravamento da fibrose da linha de base

até ao término do tratamento. Foi medida a alteração em alanina aminotransferase às 24 semanas: alteração relativa na alanina aminotransferase -24%, 95% CI -45 a -3.

#### Concepção do estudo e participantes

[00302] Os pacientes foram incluídos no estudo de acordo com os seguintes critérios de inclusão: 18 anos ou mais no momento do rastreio, evidência histológica de esteato-hepatite não-alcoólica de definitiva ou no limite com base em uma biópsia do fígado obtida 90 dias ou menos antes da randomização e uma classificação de atividade de doença histológica hepática gordurosa não-alcoólica histológica (NAFLD) de 4 ou mais com uma classificação de 1 ou mais em cada componente da classificação (esteatose classificada entre 0-3, balonamento 0-2 e inflamação lobular 0-3). A classificação e testes de biópsias para os propósitos de inscrição foram realizados no local da inscrição. Os critérios de exclusão incluem a presença de cirrose, outras causas de doença hepática, consumo substancial de álcool (>20 g/dia para mulheres ou >30 g/dia para homens), ou outras condições de confusão (ver abaixo).

#### Randomização e ocultação

[00303] Os pacientes que cumpriam os critérios de elegibilidade foram aleatoriamente atribuídos (1:1) a ácido obeticólico oral, 25 mg uma vez por dia ou placebo. Ácido obeticólico e placebo foram fornecidos como comprimidos idênticos em recipientes idênticos etiquetados com números de código. Aos pacientes, investigadores, pessoal do estabelecimento clínico e patologistas será ocultada a atribuição do tratamento.

#### Procedimentos

[00304] Após randomização, os pacientes voltaram para visitas de estudo às semanas 2, 4 e 12 e depois a cada 12 semanas até à conclusão do tratamento na semana 72 e depois 24 semanas mais

tarde. Foram obtidas amostras de sangue em estas visitas para testes bioquímicos de rotina e avaliação das concentrações de jejum de lipídios, glucose e insulina. Peso, altura e circunferências de cintura e anca foram medidos na avaliação inicial e nos momentos intercalares designados. Todos os pacientes receberam recomendações padrão sobre hábitos alimentares saudáveis, redução de peso, exercício e a gestão de hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes, quando indicado.

[00305] Biópsias hepáticas de linha de base e de fim de tratamento foram avaliadas centralmente como um grupo de classificação de consenso de cada componente da classificação de atividade NAFLD, foi determinada a fase de fibrose e atribuído um diagnóstico de esteato-hepatite não-alcoólica, esteato-hepatite não-alcoólica duvidosa ou não esteato-hepatite não-alcoólica.

#### *Crerios de inclusao e exclusao*

[00306] Pacientes que preenchem qualquer um dos seguintes critérios de exclusao foram considerados inelegíveis para inscriao: 1) Historial ou consumo atual significativo de álcool por um período de mais de 3 meses consecutivos no prazo de 1 ano antes do rastreio (consumo significativo de álcool foi definido como mais de 20 g/dia no sexo feminino e mais de 30 g/dia no sexo masculino, em média); 2) Impossibilidade de quantificar de forma fiável o consumo de álcool com base em avaliação local do investigador; 3) Uso de drogas historicamente associadas com NAFLD por mais de 2 semanas no ano anterior à randomização; 4) Cirurgia ou intervenao bariátrica anterior ou planeada; 5) Diabetes descontrolada definida como HbA1c de 80,3 mmol/mol ou superior no prazo de sessenta dias antes da data de inscriao; 6) Presenaa de cirrose em biópsia hepática, 7) Contagem de plaquetas <100 ×10<sup>9</sup>/L; 8) Provas clínicas de descompensação hepática como definida pela presenaa de qualquer dos seguintes

anormalidades: albumina sérica inferior a 32 g/L, INR superior a 1,3, bilirrubina direta superior a 22,2  $\mu\text{mol/L}$ , ou um historial de varizes de esôfago, ascite ou encefalopatia hepática; 9) Provas da existência de outras formas de doença hepática crônica: hepatite B como definido pela presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), hepatite C conforme definido pela presença do vírus da hepatite C (HCV) RNA ou anticorpo de hepatite C (anti-HCV) positivo, prova da existência de doença hepática auto-imune como definido por histologia hepática compatível, cirrose biliar primária conforme definido pela presença de pelo menos 2 critérios (provas bioquímicas de colestase baseada principalmente na elevação da fosfatase alcalina, presença de anticorpo anti-mitocondrial [AMA], e prova histológica de colangite destrutiva não supurativa e destruição das vias biliares interlobulares), colangite esclerosante primária, doença de Wilson conforme definido por ceruloplasmina abaixo dos limites normais e compatíveis de histologia hepática, deficiência de alfa-1-antitripsina (A1AT) conforme definido por propriedades de diagnóstico na histologia hepática (confirmada por nível de alfa-1 antitripsina inferior ao normal, exclusão a critério do investigador local), história de hemocromatose ou sobrecarga de ferro conforme definida pela presença de ferro colorável 3+ ou 4+ na biópsia hepática, doença hepática induzida por drogas conforme definido na base de exposição típica e história, obstrução conhecida das vias biliares, suspeita ou comprovação de câncer de fígado, ou qualquer outro tipo de doença hepática que não NASH; 10) Alanina aminotransferase sérica (ALT) superior a 300 U/L; 11) Creatinina sérica de 176,8  $\mu\text{mol/L}$  ou superior; 12) Incapacidade de obter em segurança uma biópsia hepática; 13) Historial de desvio biliar; 14) Positividade conhecida para a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); 15) Doença médica grave ativa com provável expectativa de vida inferior a 5 anos; 16) Abuso de substâncias



ativas incluindo drogas inaladas ou injetadas no ano anterior aos rastreio; 17) Gravidez, gravidez planejada, potencial de gravidez e recusa da utilização de meios de controle de natalidade eficazes durante o ensaio, ou aleitamento materno; 18) Participação em um ensaio IND nos trinta dias anteriores à randomização; 19) Qualquer outra condição que, na opinião do investigador local, impediria o cumprimento ou prejudicaria a conclusão do estudo; ou 20) Ausência de prova de consentimento legal por parte do paciente.

### Análise Estatística

[00307] O resultado primário e resultados secundários binários foram analisados usando o teste de Mantel-Haenszel; resultados secundários contínuos foram analisados usando modelos ANCOVA associando a mudança no resultado contínuo da linha de base para 72 semanas ao grupo de tratamento e ao valor de base do resultado. Foram realizadas análises estatísticas com SAS (SAS Institute 2011, Base SAS 9.3 Procedures Guide) e Stata (StataCorp 2013, Stata Statistical Software: versão 13).

### Resultados

[00308] A medida de resultado primário foi a melhoria em histologia hepática classificada centralmente definida como uma diminuição na classificação de atividade NAFLD em pelo menos 2 pontos sem agravamento da fibrose da linha de base até ao término do tratamento. O agravamento da fibrose foi definido como qualquer aumento numérico na fase. Os resultados histológicos secundários incluem resolução de esteato-hepatite não-alcoólica, mudança de classificação de atividade NAFLD e mudanças nas classificações individuais para balonamento hepatocelular, esteatose, inflamação lobular e portal e fibrose. A melhoria da fibrose foi definida como qualquer redução numérica na fase. As fases de fibrose 1a, 1b e 1c foram consideradas fase 1, para efeitos de análise. Outros resultados secundários incluem alterações da

linha de base para 72 semanas em concentrações de aminotransferase sérica e  $\gamma$ -glutamil transpeptidase, modelo de homeostase de avaliação de resistência à insulina em jejum (HOMA-IR), medidas antropométricas (peso, índice de massa corporal, relação cintura-anca, circunferência da cintura) e classificações de qualidade de vida relacionada à saúde.

#### **Exemplo 10: Análise de dados**

[00309] Foi realizada uma subanálise dos dados obtidos no Exemplo 9 para avaliar o efeito das estatinas sobre os níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Os objetivos destas análises secundárias foram determinar o efeito da OCA versus placebo no subgrupo de pacientes com NASH mais grave e avaliar os efeitos do uso concomitante de estatina sobre o colesterol LDL sérico. Os dados dos sujeitos foram avaliados em três grupos da seguinte forma:

- Grupo A (n=64, nenhuma estatina) incluiu sujeitos no braço de tratamento com ácido obeticolico (OCA) que não estavam em tratamento com estatina na linha de base (dia 0) e que não iniciaram tratamento com estatina ao longo do estudo até e incluindo a semana 72.

- Grupo B (n=47, estatina de linha de base) incluiu sujeitos no braço de tratamento OCA que estavam em tratamento com estatina na linha de base e que continuaram em tratamento com estatina ao longo do estudo até, e incluindo, a semana 72.

- Grupo C (n=23, nova estatina) incluiu sujeitos no braço de tratamento OCA que não estavam em tratamento com estatina na linha de base, mas que iniciaram tratamento com estatina em um momento posterior à linha de base e incluindo a semana 72.

[00310] Realizaram-se os seguintes cálculos para sujeitos tratados com OCA nos grupos A, B e C.

- As características médias e medianas listadas abaixo serão avaliadas na linha de base e na semana 72.

o Valores de laboratório: LDL-C, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C), alanina e aspartato aminotransferase, gama glutamil transferase

o Idade

o Gênero: percentual masculino, percentual feminino

o Percentual de diabéticos

o Histologia: esteatose, balonamento, inflamação, fibrose

• Será avaliada a variação percentual média e mediana na semana 72 desde a linha de base das características acima.

### Resultados

[00311] O colesterol LDL aumentou durante o tratamento com OCA em pacientes a tomar estatinas na linha de base, mas os níveis não excederam os dos pacientes tratados com placebo e que não tomavam estatinas. O início do tratamento com estatina durante o tratamento OCA inverteu o LDL para níveis de base inferiores aos pré-OCA. Como mostrado na Figura 8, o aumento de LDL relacionado com COA parece ter sido revertido pelo início de terapia com estatina durante o tratamento com OCA.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende

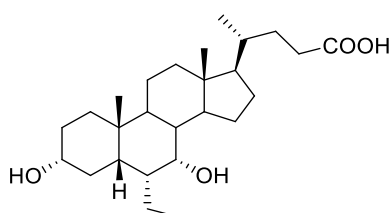
um agonista FXR,

um fibrato, e

opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável,

sendo que:

o agonista FXR é o composto de fórmula (1):



(1),

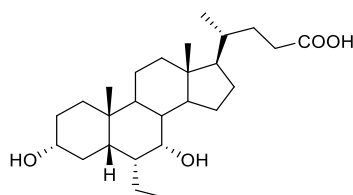
ou um sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de taurina ou glicina do mesmo; e

o fibrato é selecionado dentre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e ácido clofíbrico, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o fibrato é selecionado dentre bezafibrato, fenofibrato, e clofibrato, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o fibrato é bezafibrato.

4. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma combinação de agentes terapêuticos consistindo em um composto de fórmula (1):



(1),

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de

taurina ou glicina do mesmo, e

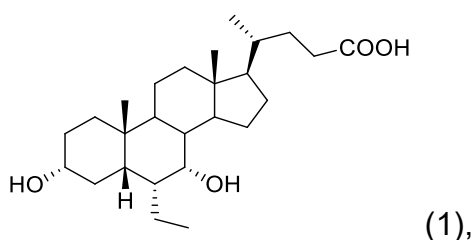
bezafibrato.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a composição é uma forma de dosagem unitária única.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de a forma farmacêutica unitária é um comprimido ou cápsula.

7. Uso de uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou condição selecionada dentre cirrose biliar primária (PBC), colangite esclerosante primária (PSC), atresia biliar, hipertensão portal, diarreia de ácidos biliares, doença hepática crônica, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não induzida pelo álcool (NASH), infecção por hepatite C, doença hepática alcoólica, danos hepáticos devidos a fibrose progressiva, e fibrose hepática.

8. Uso de uma combinação de um agonista FXR, que é o composto de fórmula (1):



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou conjugado de taurina ou glicina do mesmo, e

um fibrato, em que o fibrato é selecionado dentre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato e ácido clofíbrico, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou condição

selecionada dentre cirrose biliar primária (PBC), colangite esclerosante primária (PSC), atresia biliar, hipertensão portal, diarreia de ácidos biliares, doença hepática crônica, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não induzida pelo álcool (NASH), infecção por hepatite C, doença hepática alcoólica, danos hepáticos devidos a fibrose progressiva, e fibrose hepática.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o fibrato é selecionado a partir de bezafibrato, fenofibrato e clofibrato, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o fibrato é o bezafibrato.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula (1) está em uma quantidade de 1-30 mg.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula (1) está em uma quantidade de 5-25 mg.

13. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que o fibrato está em uma quantidade de 80-400 mg.

14. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, caracterizado pelo fato de que o fibrato está em uma quantidade de 200 mg.

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, caracterizado pelo fato de que o fibrato está em uma quantidade de 400 mg.

Figura 1A

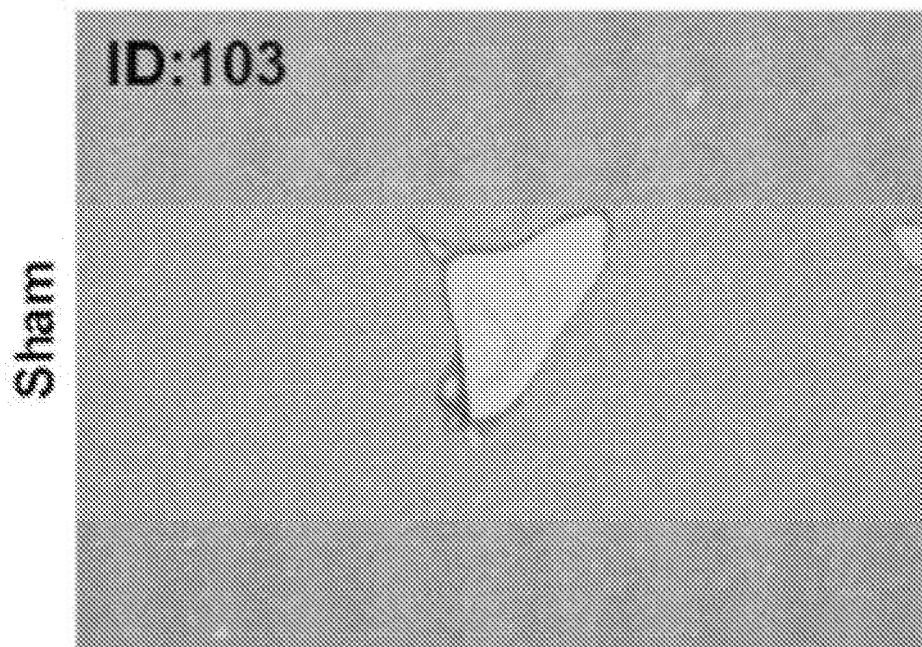


Figura 1B

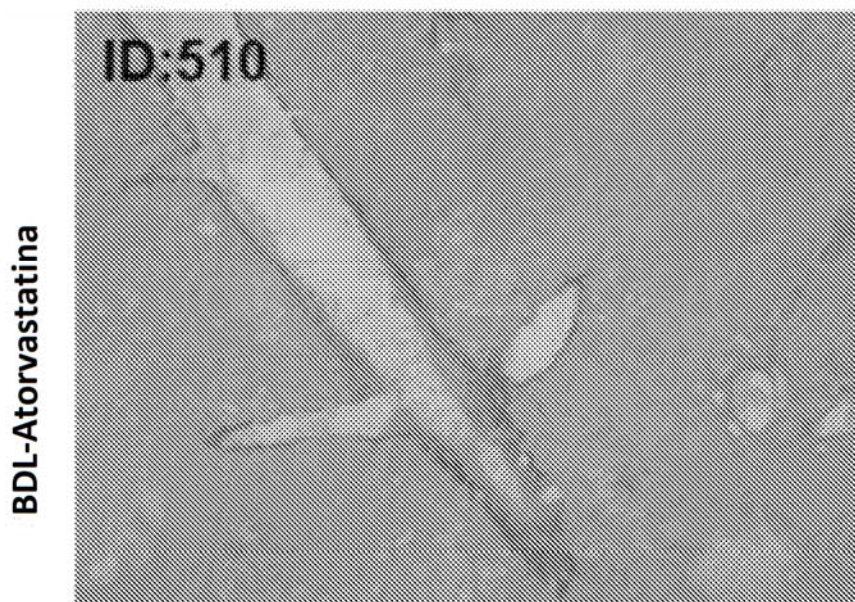




Figura 1C



Figura 1D





**Figura 1E**

**BDL-OCA-Atorvastatina**

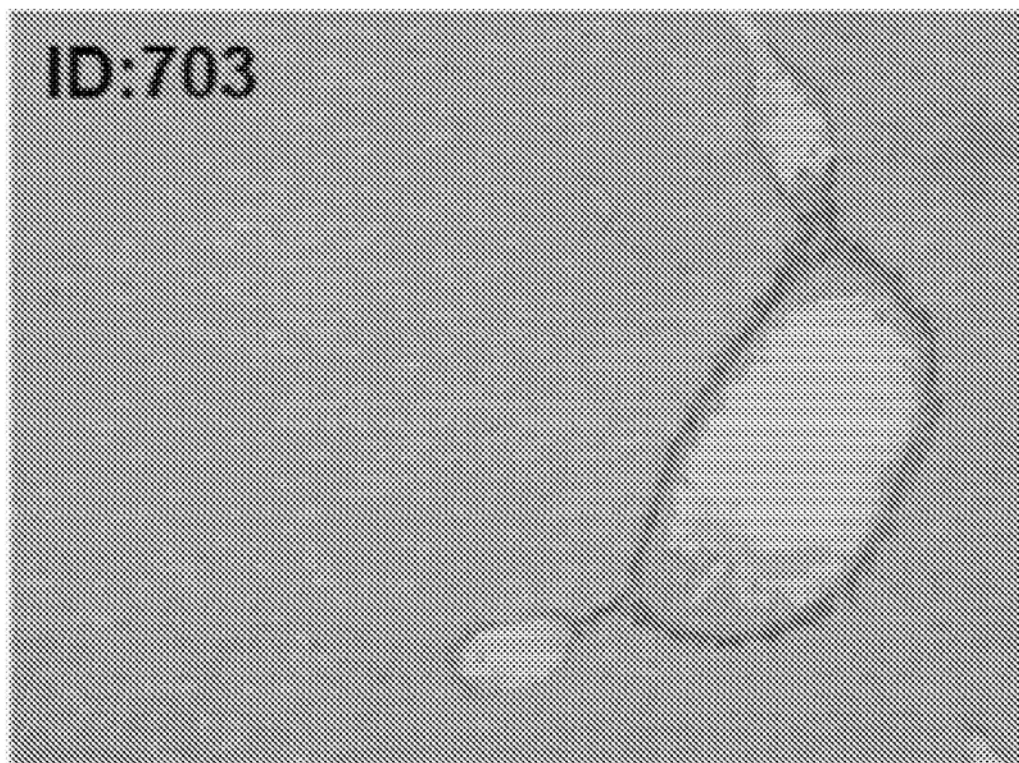


Figura 2

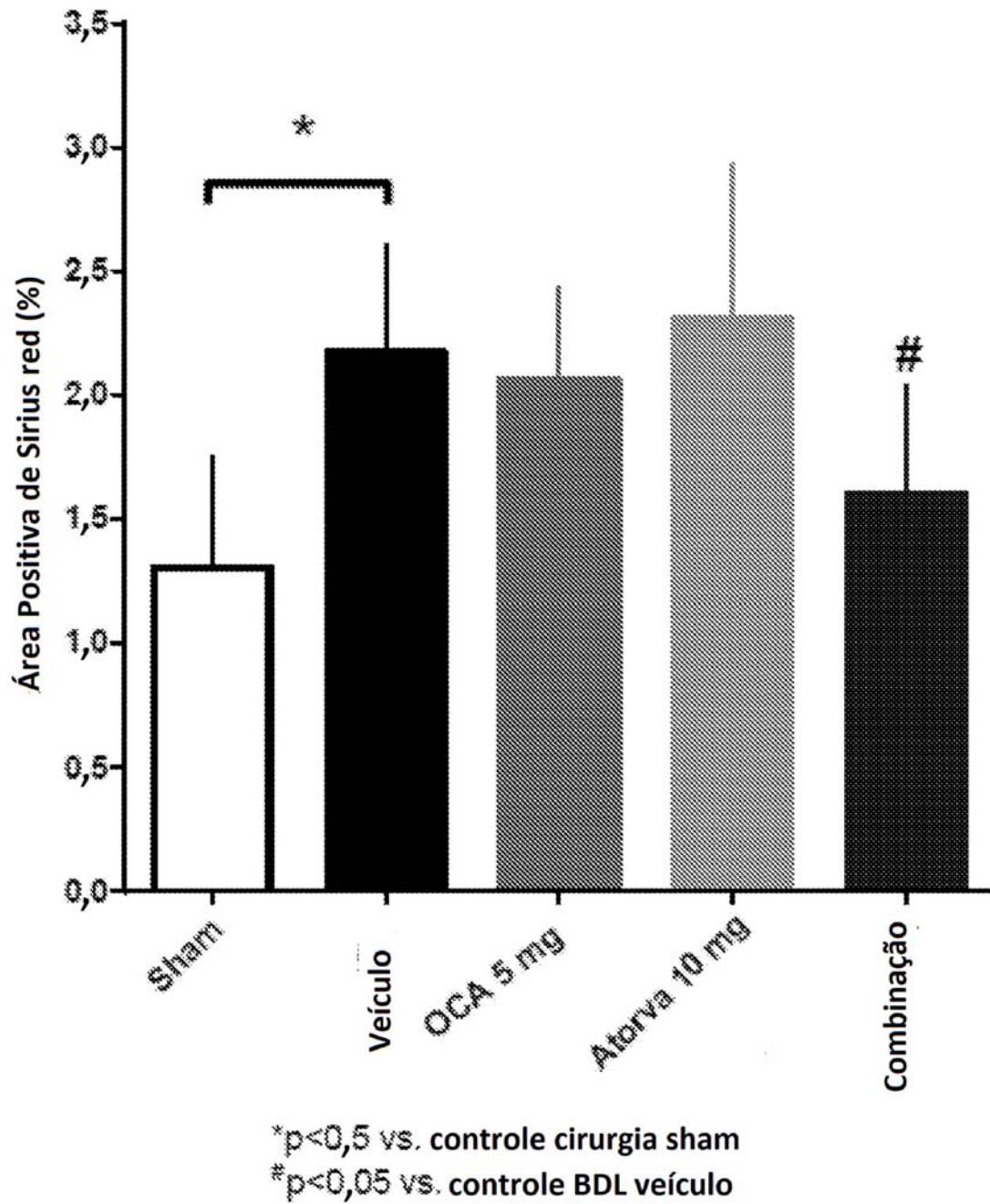
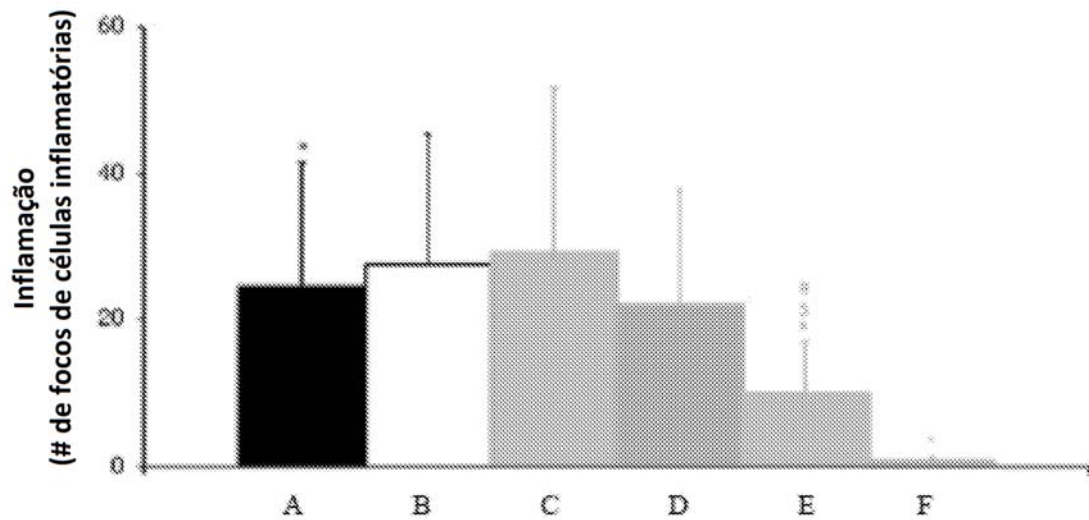


Figura 3A



Coluna A: grupo referência HFC

Coluna B: grupo de controle HFC

Coluna C: OCA

Coluna D: fenofibrato em dose baixa

Coluna E: OCA + fenofibrato em dose baixa

Coluna F: controle de ração

\*  $p < 0,05$  vs. controle

#  $p < 0,05$  vs. OCA

\$  $p < 0,05$  vs. fenofibrato



Figura 3B

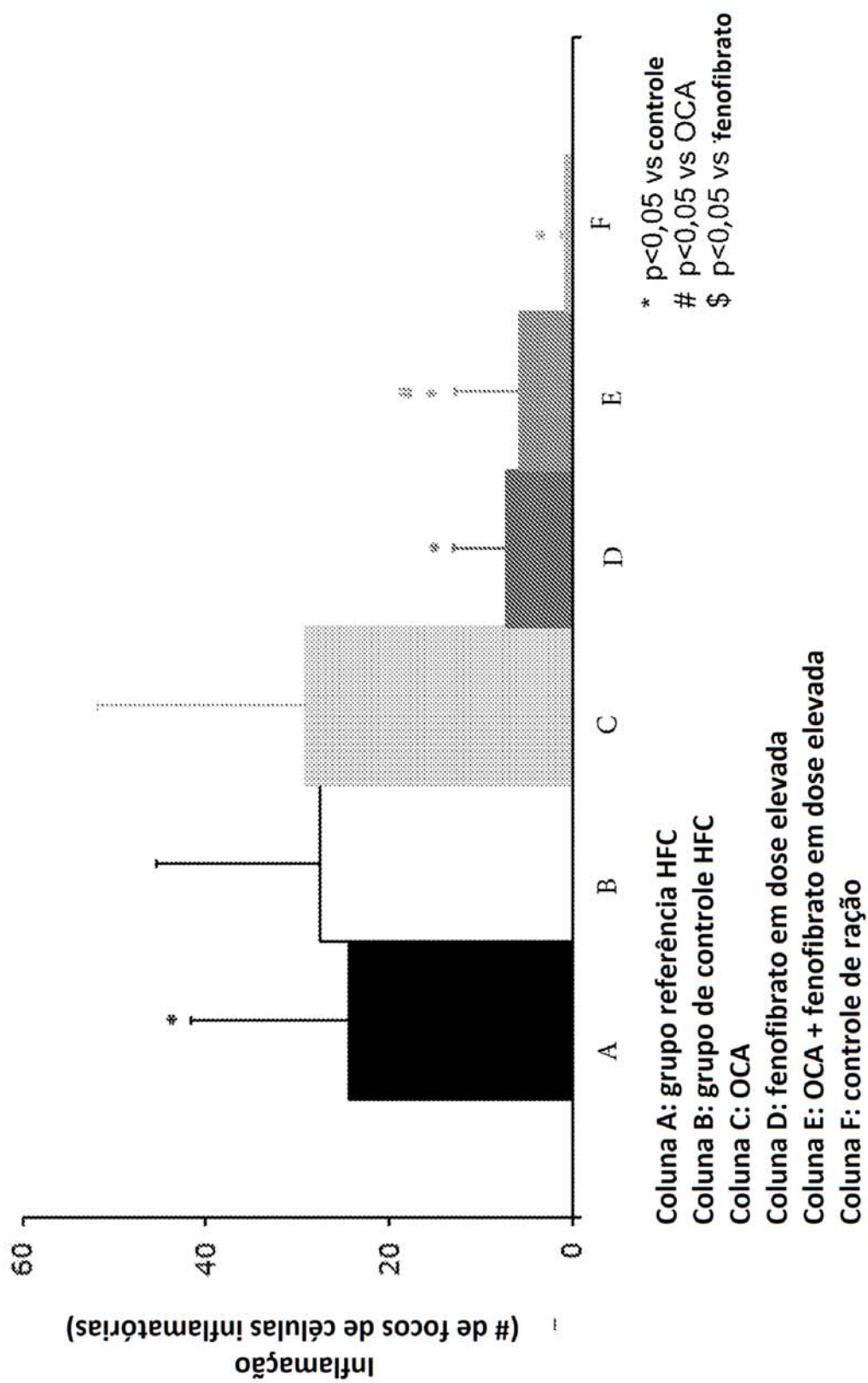
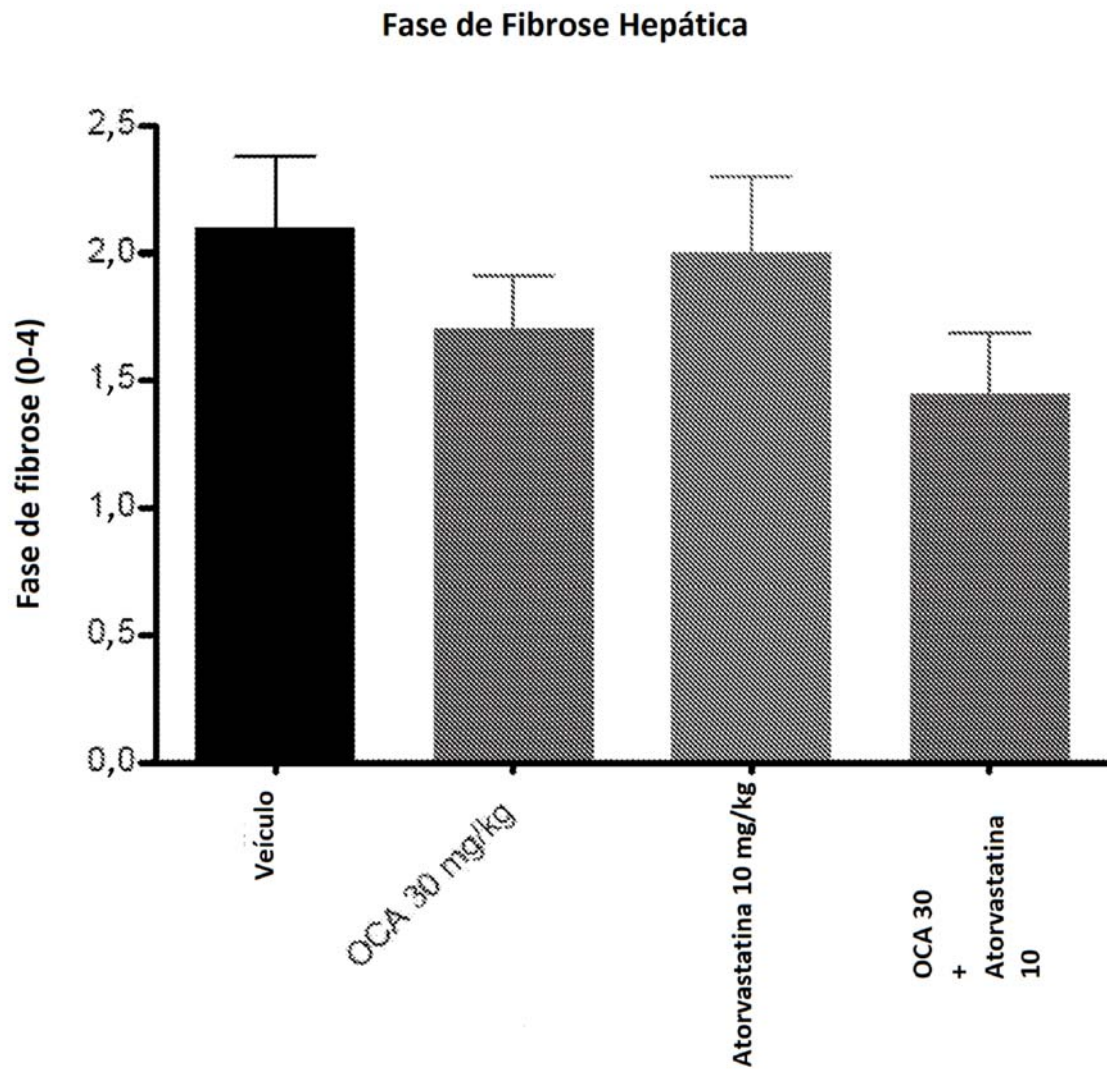


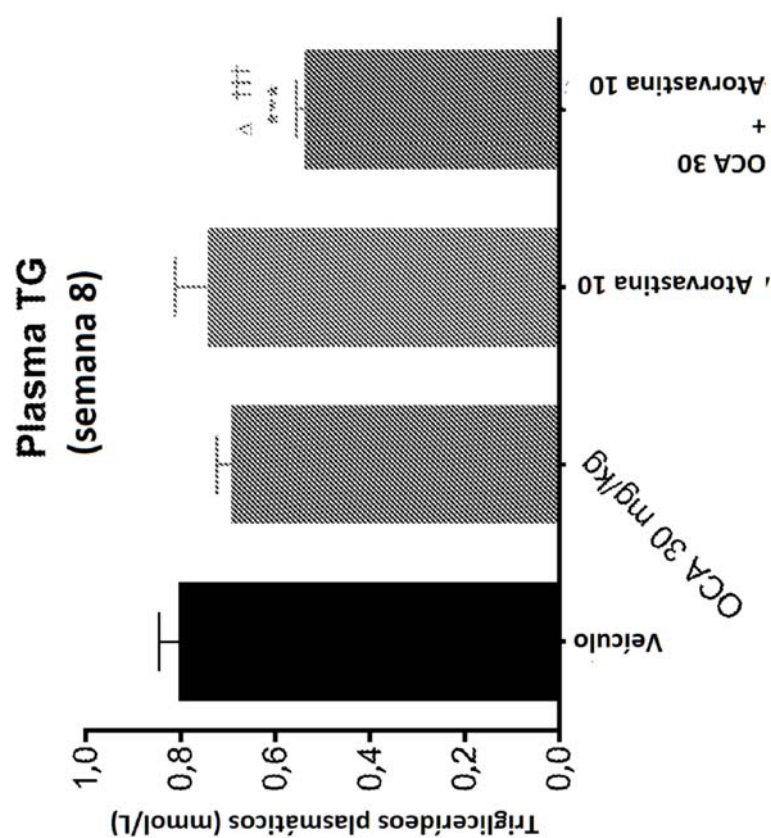
Figura 4



Média  $\pm$  SEM (n=9-11);

INS; One-Way Anova com teste de comparação múltipla de Tukey

Figura 5A



Média  $\pm$  SEM (n=9-11);

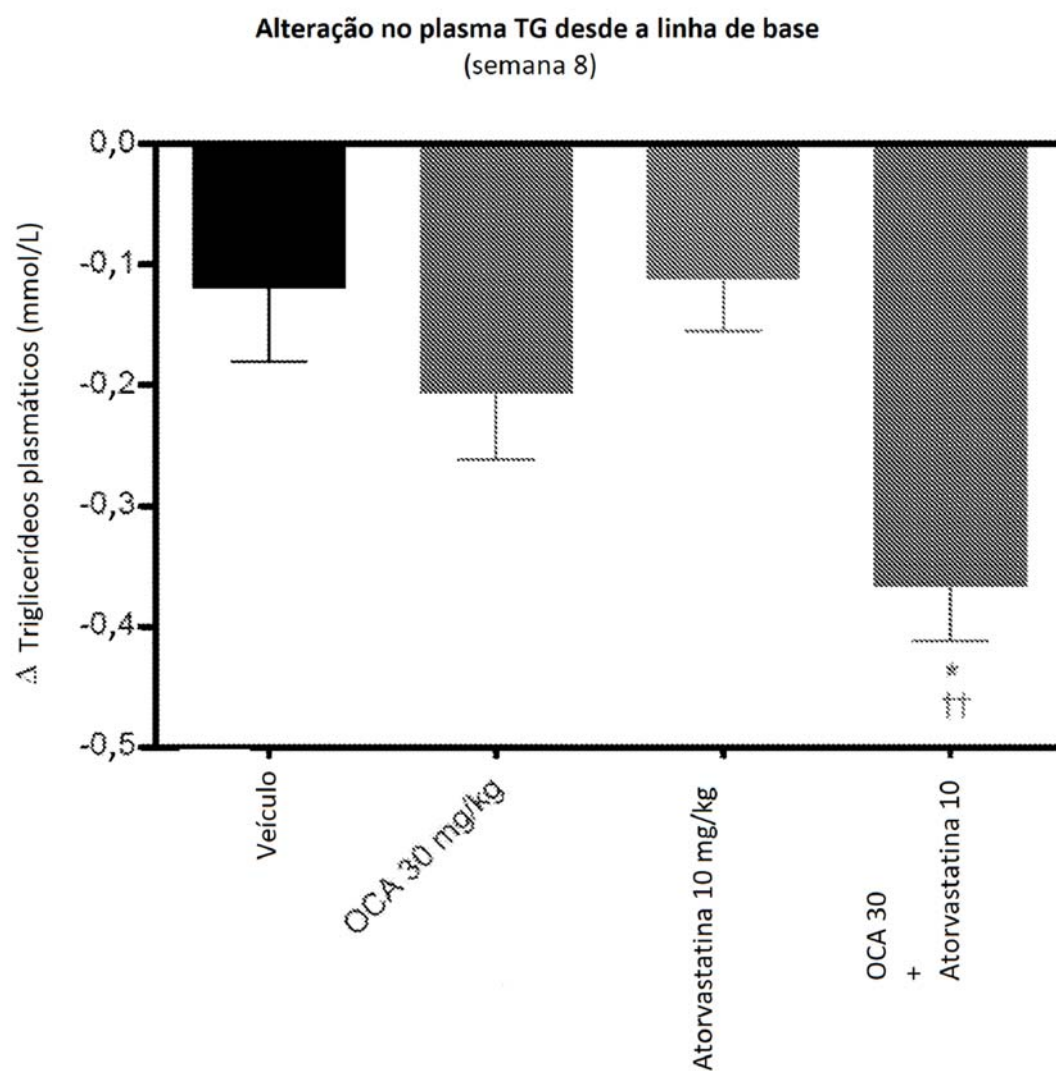
\*\*\* $p < 0,001$  vs. veículo;

$\Delta p < 0,05$  vs. OCA 30 mg/kg;

††† $p < 0,001$  vs. Atorvastatina 10 mg/kg

One-Way Anova com teste de comparação múltipla de Tukey

Figura 5B



Média ± SEM (n=9-11);

\* $P < 0,05$  vs. veículo;

## $P < 0,01$  vs. Atorvastatina 10 mg/kg

One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey

Figura 6A

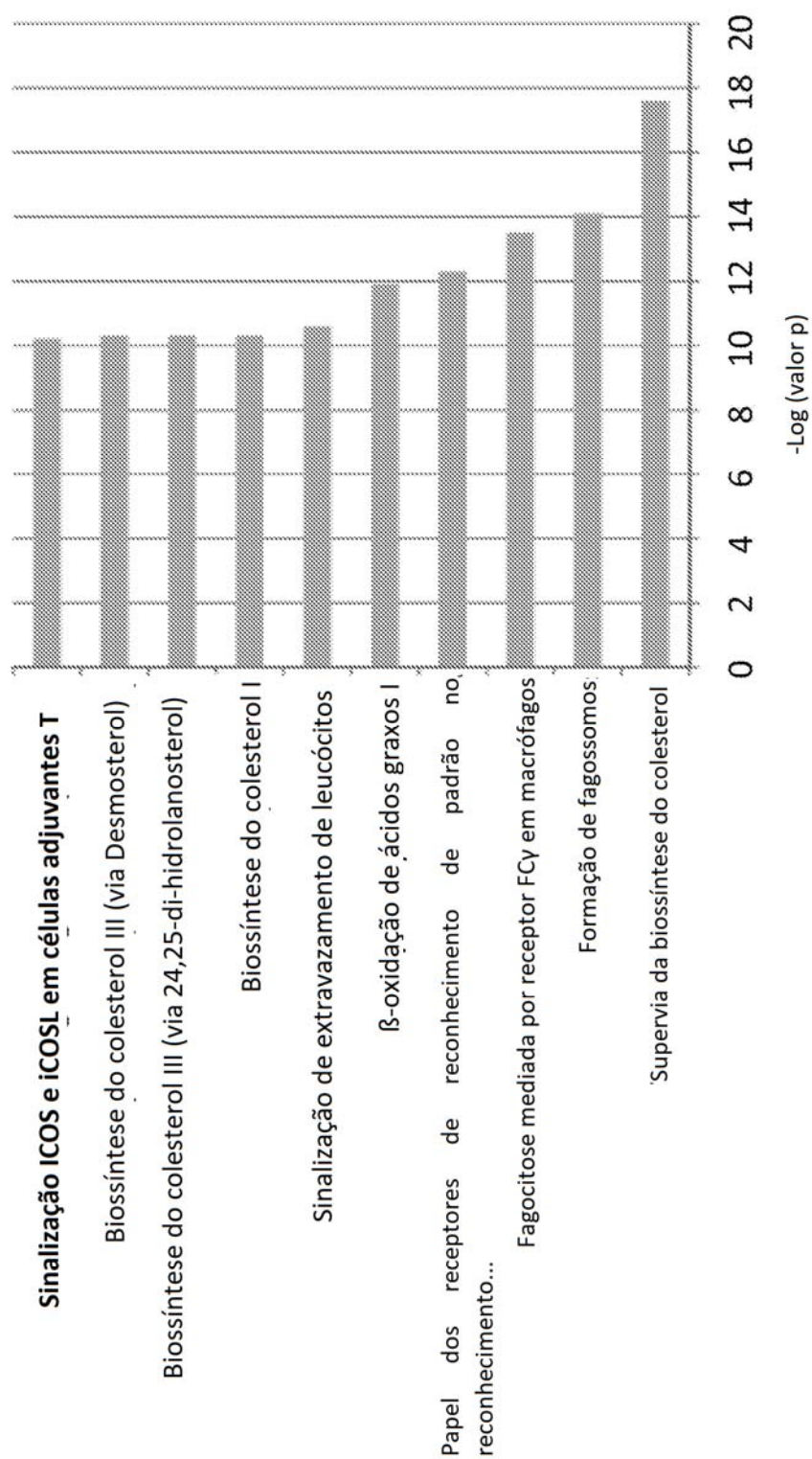




Figura 6B

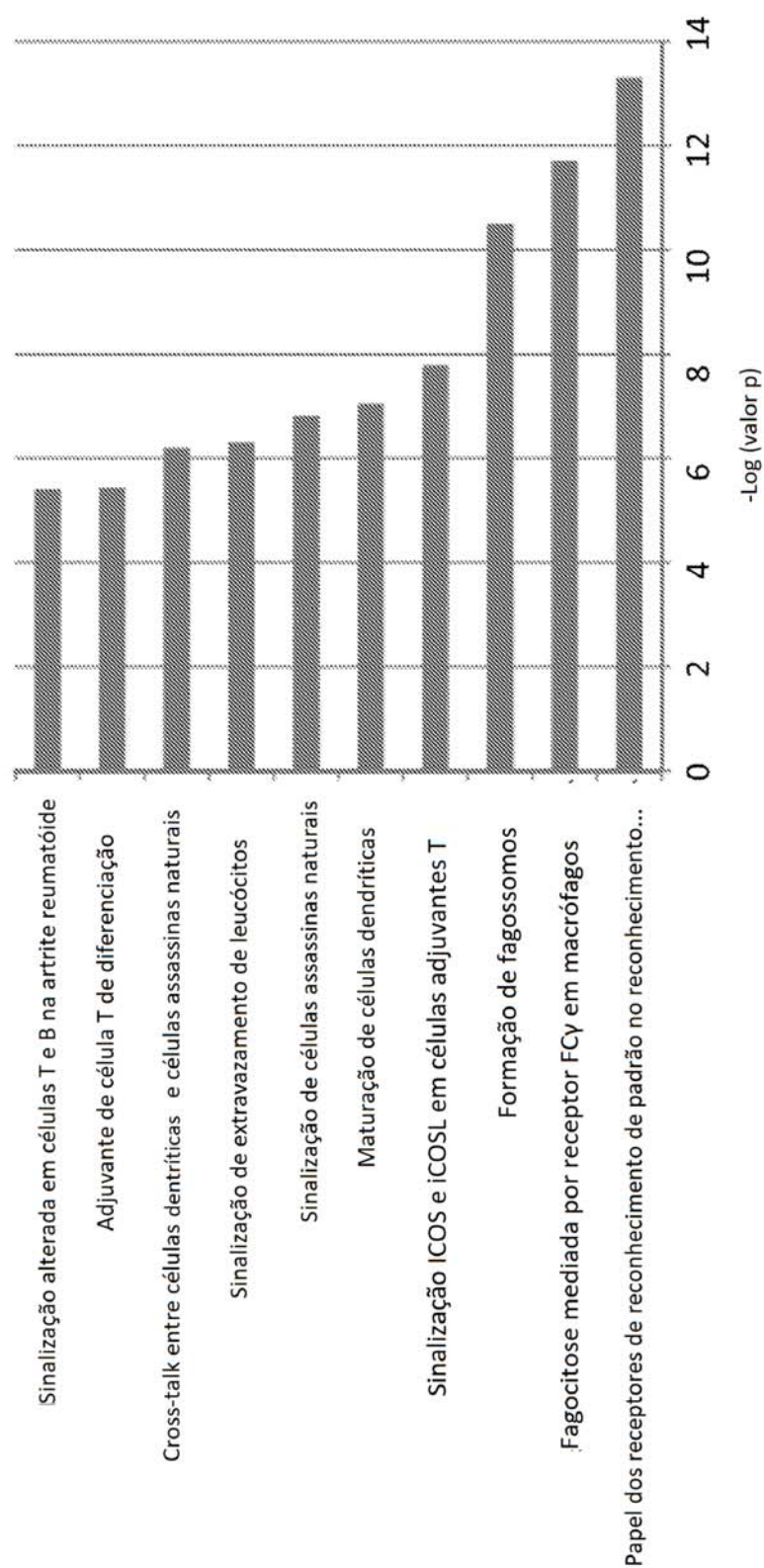


Figura 7A

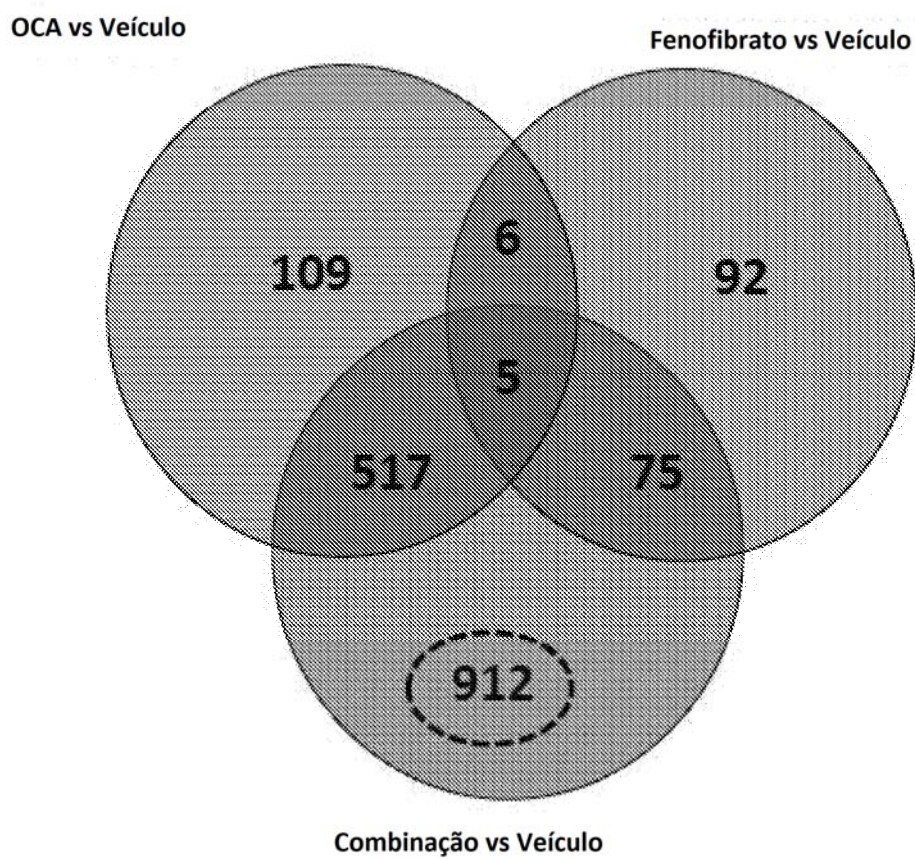


Figura 7B

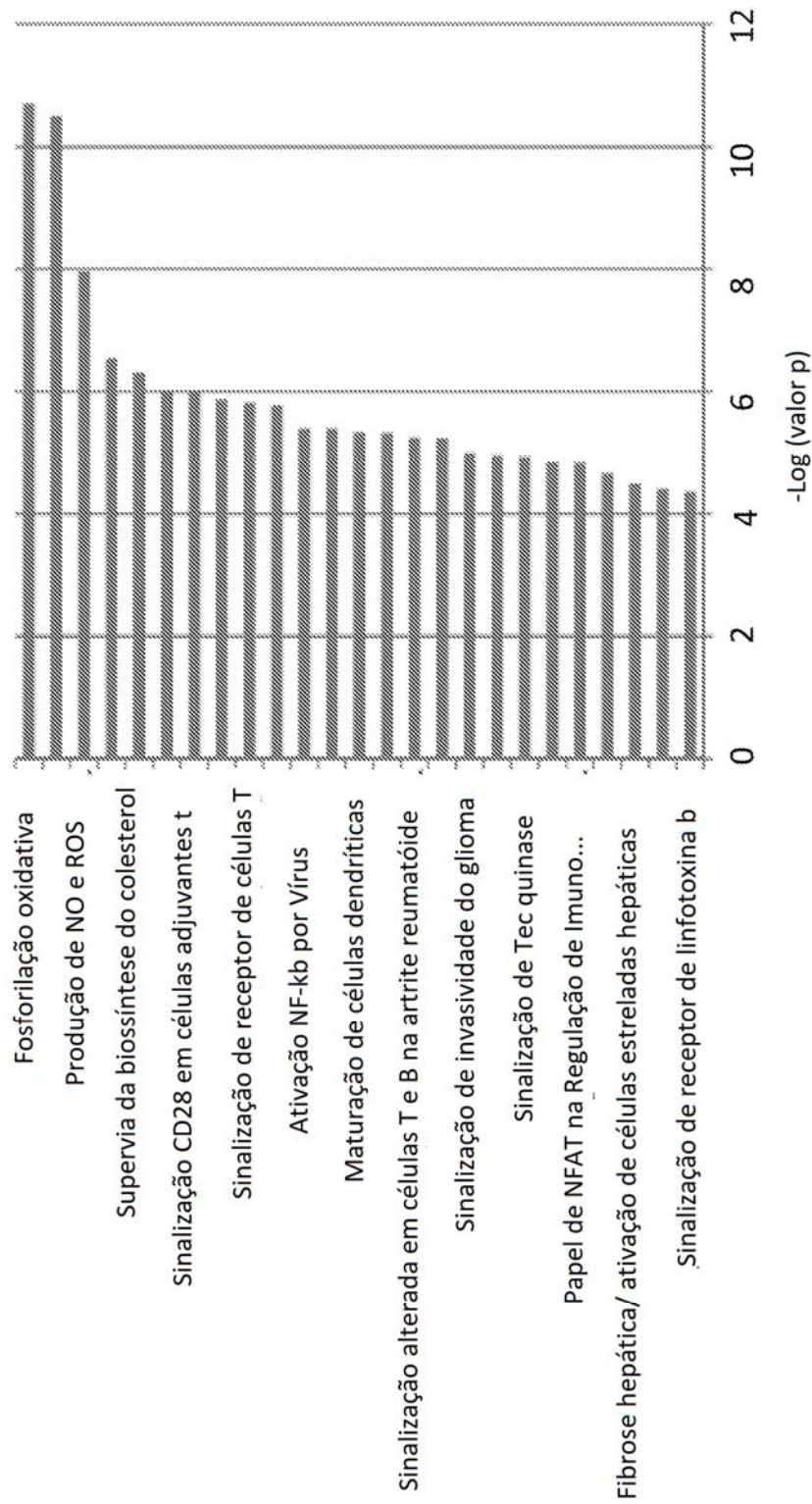


Figura 8

