



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201642869 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：105110879

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 04 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K31/573 (2006.01)

A61K31/155 (2006.01)

A61K38/26 (2006.01)

(30)優先權：2015/04/07 美國

62/144,040

(71)申請人：英特賽普醫藥品公司 (美國) INTERCEPT PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：普桑斯基 馬克 PRUZANSKI, MARK (CA)；亞多瑞尼 路希亞諾 ADORINI,
LUCIANO (IT)

(74)代理人：蔡清福；蔡馭理

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：16 共 119 頁

(54)名稱

組合療法醫藥組合物

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR COMBINATION THERAPY

(57)摘要

本申請案涉及一醫藥組合物，該醫藥組合物包含一 FXR 激動劑與至少一種另外的治療劑的組合，該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。本申請案涉及該醫藥組合物用於治療或預防 FXR 介導的疾病或病狀（如 NAFLD 和 NASH）、與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關的疾病或病狀（如高血糖症、糖尿病、肥胖症以及胰島素抗性）或用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性之用途。

The present application relates to a pharmaceutical composition comprising a combination of an FXR agonist and at least one additional therapeutic agent that lowers the glucose level in the blood, stimulates insulin secretion, and/or increases insulin sensitivity. The present application relates to use of the pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a FXR mediated disease or condition, such as NAFLD and NASH, a disease or condition related to an elevated level of glucose in the blood, decreased secretion of insulin, and/or decreased insulin sensitivity such as hyperglycemia, diabetes, obesity, and insulin resistance, or for lowering the glucose level in the blood, stimulating insulin secretion, and/or increasing insulin sensitivity.

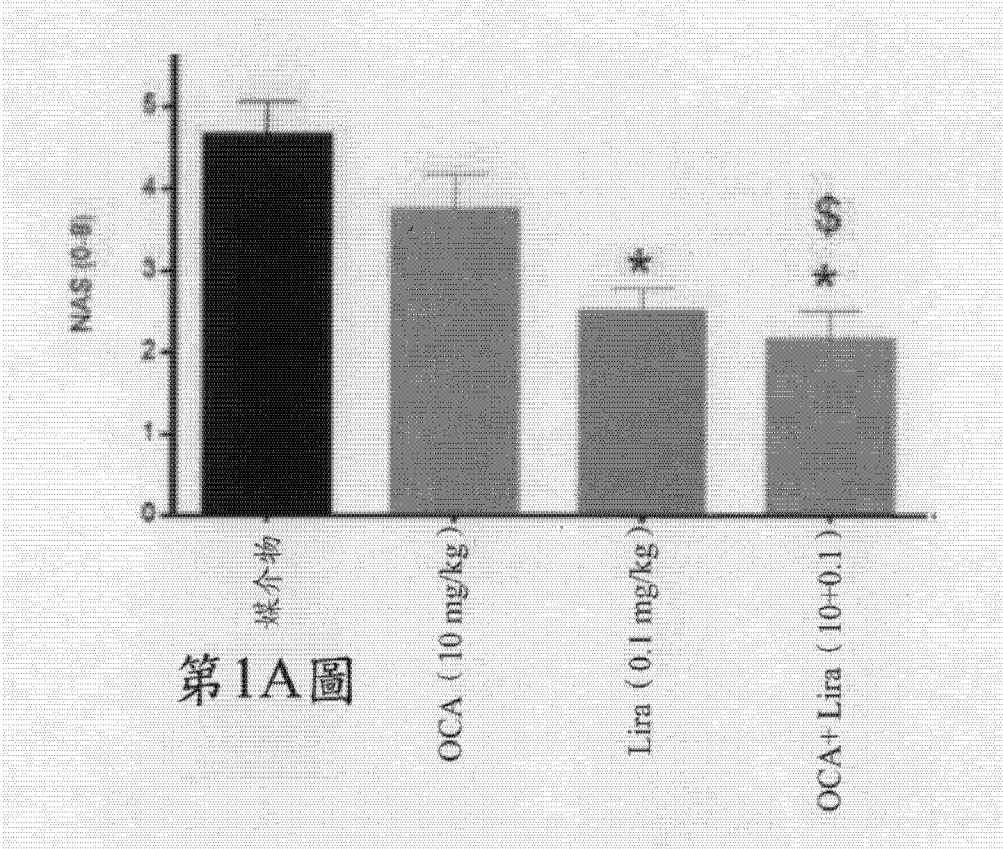
指定代表圖：

符號簡單說明：

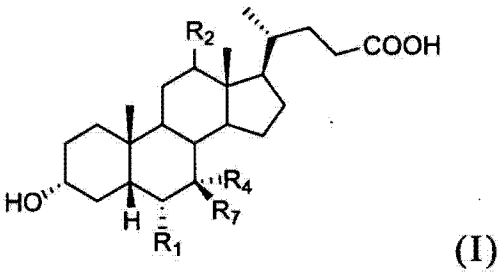
Lira . . . 利拉魯肽

NAS . . . 非酒精性
脂肪肝病(NAFLD)活
動度評分

OCA . . . 奧貝膽酸



特徵化學式：





申請日: 105. 4. -7

201642869

【發明摘要】

IPC分類: A61K 31/573 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

【中文發明名稱】 組合療法醫藥組合物

【英文發明名稱】 Pharmaceutical Compositions For Combination Therapy

【中文】

本申請案涉及一醫藥組合物，該醫藥組合物包含一FXR激動劑與至少一種另外的治療劑的組合，該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。本申請案涉及該醫藥組合物用於治療或預防FXR介導的疾病或病狀（如NAFLD和NASH）、與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關的疾病或病狀（如高血糖症、糖尿病、肥胖症以及胰島素抗性）或用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性之用途。

【英文】

The present application relates to a pharmaceutical composition comprising a combination of an FXR agonist and at least one additional therapeutic agent that lowers the glucose level in the blood, stimulates insulin secretion, and/or increases insulin sensitivity. The present application relates to use of the pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a FXR mediated disease or condition, such as NAFLD and NASH, a disease or condition related to an elevated level of glucose in the blood, decreased secretion of insulin, and/or decreased insulin sensitivity such as hyperglycemia, diabetes, obesity, and insulin resistance, or for lowering the glucose level in the blood, stimulating insulin secretion, and/or increasing insulin sensitivity.

【指定代表圖】 第1A圖

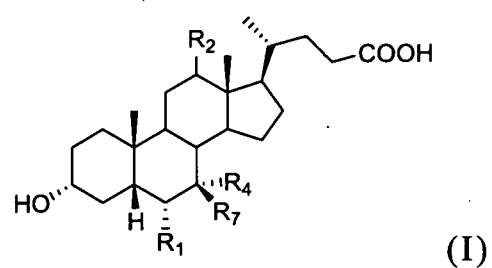
【代表圖之符號簡單說明】

Lira 利拉魯肽

NAS 非酒精性脂肪肝病（NAFLD）活動度評分

OCA 奧貝膽酸

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 組合療法醫藥組合物

【英文發明名稱】 Pharmaceutical Compositions For Combination Therapy

【技術領域】

【0001】代謝病症（包括糖尿病和胰島素抗性綜合症）特徵在於各種各樣的代謝風險標記的異常，如高胰島素血症、糖代謝受損、甘油三酯的血漿水平升高、高密度脂蛋白膽固醇水平降低、血壓升高以及肥胖症。血液中葡萄糖的濃度升高、胰島素分泌減少和/或胰島素抗性增加可能涉及多種病狀，包括原發性膽汁性肝硬化（PBC）、原發性硬化性膽管炎（PSC）、各種慢性肝炎狀態（乙型肝炎和丙型肝炎）、非酒精性脂肪肝病（NAFLD）以及非酒精性脂肪性肝炎（NASH）。當前治療靶向胰島素抗性（例如，二甲雙胍、噻唑啉二酮類（“TZD”））或來自 β 細胞的胰島素釋放（例如，磺醯脲類、艾塞那肽（exenatide））。然而，該等治療存在各種缺陷，包括副作用、功效有限以及不希望的長期作用。

【先前技術】

【0002】膽汁酸參與各種代謝過程的調控，並且不僅調節它們自己的合成和肝腸循環，而且調節甘油三酯、膽固醇、葡萄糖以及能量平衡。膽汁酸還可以藉由調節能量消耗而在調節腸促胰島素釋放和代謝調控中起其他作用。此外，膽汁酸螯合劑（BAS）已顯示出在各種肝病（如NAFLD和NASH）、血糖代謝障礙和II型糖尿病的治療中的作用。

【0003】膽汁酸結合到核受體FXR，該受體參與膽汁酸體內平衡。已提出糖尿病與FXR表現的失調相關。FXR似乎不僅在修飾餐後過程中的碳水化

第 1 頁，共 84 頁(發明說明書)

合物誘導的基因表現以及肝葡萄糖產生和空腹肝葡萄糖利用方面起作用，而且參與對於藉由維護餐後肝葡萄糖產生和肝醣貯積而預防空腹低血糖來說必要的一系列複雜的糖異生基因的調控。此外，FXR活化在餐後狀態抑制葡萄糖反應基因如L型丙酮酸激酶（L-PK）的誘導。

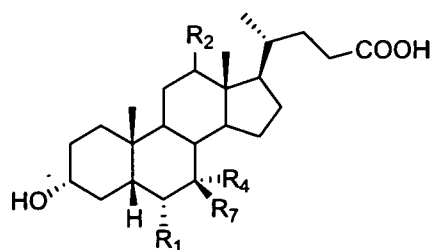
【0004】因此，對於用於治療或預防與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關的各種疾病或病狀的醫藥組合物存在尚未滿足的需求，該等醫藥組合物包含FXR激動劑和至少一種另外的治療劑，該至少一種另外的治療劑降低血糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。本申請案解決了這類需求。

【發明內容】

【0005】本申請案涉及一醫藥組合物，該醫藥組合物包含(i)一第一化合物，(ii)至少一種另外的治療劑，以及(iii)視情況一種或多種藥學上可接受的載體，其中該第一化合物係一FXR激動劑，並且該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。

【0006】本申請案還涉及本申請案之醫藥組合物之治療用途。

【0007】在一個實施方式中，該第一化合物係具有式I之化合物：



(I) ,

或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軀合物 (conjugate)，其中R¹、R₂、R₄以及R₇係如在此所定義。

【0008】本申請案還涉及用於治療或預防FXR介導的疾病或病狀和/或與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性的降低有關的疾病或病狀之方法，該等方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實施方式中，該FXR介導的疾病或病狀係藉由FXR活化治療的。

【0009】本申請案還涉及用於治療或預防非酒精性脂肪肝病（NAFLD）或非酒精性脂肪性肝炎（NASH）之方法，該等方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。

【0010】本申請案還涉及用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性之方法，該等方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。

【0011】本申請案還涉及用於治療或預防高血糖症、糖尿病或肥胖症之方法，該等方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。

【0012】本申請案還涉及本申請案之醫藥組合物用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌、提高胰島素敏感性、治療或預防FXR介導的疾病或病狀和/或與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低有關的疾病或病狀和/或治療或預防NAFLD、NASH、高血糖症、糖尿病或肥胖症的用途。在一個實施方式中，該疾病或病狀係藉由FXR活化治療的。

【0013】本申請案還涉及本申請案之醫藥組合物在製造用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌、提高胰島素敏感性、治療或預防FXR介導的疾病或病狀和/或與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低有關的疾病或病狀和/或治療或預防NAFLD、NASH、高血

糖症、糖尿病或肥胖症的藥劑中的用途。在一個實施方式中，該疾病或病狀係藉由FXR活化治療的。

【0014】本申請案的組合物和方法解決在治療或預防其中涉及血液中葡萄糖的濃度升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低方面未滿足的需求。

【圖式簡單說明】

【0015】第1A圖係示出單獨的和組合的低劑量奧貝膽酸（OCA）和利拉魯肽（LIRA）對總NAS的作用之橫條圖。 $*p<0.05$ 對比對照並且 $^{\$}p<0.05$ 對比OCA。第1B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA對總NAS的作用之橫條圖。 $*p<0.05$ 對比對照。

第2A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA對NAS的脂肪變性組分的作用之橫條圖。 $*p<0.05$ 對比對照並且 $^{\$}p<0.05$ 對比OCA。第2B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA對NAS的脂肪變性組分的作用之橫條圖。 $*p<0.05$ 對比對照， $^{\$}p<0.05$ 對比OCA，並且 $^{\wedge}p<0.05$ 對比LIRA。

第3A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA對總肝甘油三酯含量的作用之橫條圖。 $^{###}p<0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物， $^{***}p<0.001$ 對比DIO-NASH媒介物；並且 $^{\wedge}p<0.05$ 對比DIO-NASH OCA（10 mg/kg）。第3B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA對總肝甘油三酯含量的作用之橫條圖。 $^{###}P<0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物， $^{**}p<0.05$ 和 $^{***}p<0.001$ 對比DIO-NASH媒介物。

第4A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA對總肝膽固醇含量的作用之橫條圖。 $^{###}p<0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物； $*p<0.05$ 和 $^{***}p<0.001$ 對比DIO-NASH媒介物。第4B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA

第 4 頁，共 84 頁(發明說明書)

對總肝膽固醇含量的作用之橫條圖。^{###} $p < 0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物；
^{**} $p < 0.01$ 和^{***} $p < 0.001$ 對比DIO-NASH媒介物。

第5圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA對研究週期過程中的體重的作用的圖。

第6A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA對脂肪組織質量相對於體重的變化的作用之橫條圖。第6B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA對組織質量相對於體重的變化的作用之橫條圖。

第7A圖至第7E圖描述對受單獨的和組合的低劑量OCA和LIRA獨特調控的基因的作用。^{*} $p < 0.005$ 對比媒介物對照。第7A圖係示出對誘導細胞死亡的DFFA樣效應子C的表現水平的作用之橫條圖。第7B圖係示出對含死亡效應子結構域的DNS結合蛋白的表現水平的作用之橫條圖。第7C圖係示出對2-羥基醯基-CoA-裂解酶的表現水平的作用之橫條圖。第7D圖係示出對凝集素（半乳糖結合蛋白）的表現水平的作用之橫條圖。第7E圖係示出對氧甾酮結合蛋白樣3受體的表現水平的作用之橫條圖。

第8A圖至第8D圖描述對受單獨的和組合的高劑量OCA和LIRA獨特調控的基因的表現水平的作用。^{*} $p < 0.005$ 對比媒介物對照並且[#] $p < 0.05$ 對比媒介物對照。第8A圖係示出對雌激素受體1的表現水平的作用之橫條圖。第8B圖係示出對胰島素誘導的基因2的表現水平的作用之橫條圖。第8C圖係示出對脂質1的表現水平的作用之橫條圖。第8D圖係示出對泛醇-細胞色素C還原酶鉸鏈蛋白的表現水平的作用之橫條圖。

第9A圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和二甲雙胍（MET）對總NAS的作用之橫條圖。^{*} $p < 0.005$ 對比媒介物對照。第9B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和MET對NAS的脂肪變性組分的作用之橫條圖。

第10A圖係示出在第4週使用OGTT，單獨的和組合的低劑量OCA and MET對降低血糖的作用的圖。^{##} $p < 0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物，^{**} $p < 0.01$ 和^{***} $p < 0.001$ 對比DIO-NASH媒介物，^{ΔΔΔ} $p < 0.05$ 對比DIO-NASH OCA (10 mg/kg)，並且^{††} $p < 0.05$ 對比DIO-NASH MET (50 mg/kg)。第10B圖係示出在第4週使用OGTT，單獨的和組合的低劑量OCA and MET對降低血糖的作用的圖。^{##} $p < 0.001$ 對比LEAN-CHOW媒介物，^{*} $p < 0.05$ ，^{***} $p < 0.001$ 對比DIO-NASH媒介物；並且^Δ $p < 0.005$ ，^{ΔΔ} $p < 0.0$ ，^{1ΔΔΔ} $p < 0.001$ 對比DIO-NASH OCA (30 mg/kg)。

第11圖係示出由單獨的和組合的低劑量和高劑量的OCA and MET調控的基因的數目之橫條圖。

第12A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and 二甲雙胍對基因表現的作用的文氏圖表。第12B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA and MET對基因表現的作用的文氏圖表。第12C圖係比較由低劑量和高劑量的OCA and MET調控的基因的數目的文氏圖表。

第13A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對6a2型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。第13B圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對4a2型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。第13C圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對5a1型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。

第14A圖至第14F圖描述對受單獨的和組合的低劑量OCA and MET獨特調控的某些基因的表現水平的作用。^{*} $p < 0.005$ 對比媒介物對照。第14A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對核心蛋白聚糖的mRNA表現的作用之橫條圖。第14B圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對層連結蛋白亞基1的mRNA表現的作用之橫條圖。第14C圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA and MET對單核細胞至巨噬細胞分化因子2的mRNA表現的作用之橫

第 6 頁，共 84 頁(發明說明書)

條圖。第14D圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對轉化生長因子B1轉錄物的mRNA表現的作用之橫條圖。第14E圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和MET對腫瘤壞死因子受體超家族成員11b的mRNA表現的作用之橫條圖。第14F圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對腫瘤壞死因子受體超家族成員19的mRNA表現的作用之橫條圖。

第15A圖至第15C圖描述對受單獨的和組合的高劑量OCA和MET調控的某些膠原的表現水平的作用。 $*p<0.005$ 對比媒介物對照。第15A圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和MET對14a1型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。第15B圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和MET對6a1型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。第15C圖係示出單獨的和組合的高劑量OCA和MET對6a2型膠原的mRNA表現的作用之橫條圖。

第16A圖至第16E圖描述對受單獨的和組合的高劑量OCA和MET獨特調控的某些基因的表現水平的作用。 $*p<0.005$ 對比媒介物對照。第16A圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對血小板源性生長因子受體 β 的mRNA表現的作用之橫條圖。第16B圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對核心蛋白聚糖的mRNA表現的作用之橫條圖。第16C圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對colectin亞家族成員10的mRNA表現的作用之橫條圖。第16D圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對轉化生長因子 β 受體III的mRNA表現的作用之橫條圖。第16E圖係示出單獨的和組合的低劑量OCA和MET對轉化生長因子的(β 誘導的)mRNA表現的作用之橫條圖。

【實施方式】

【0016】本申請案涉及一醫藥組合物，該醫藥組合物包含(i)一第一化合物，(ii)至少一種另外的治療劑，以及(iii)視情況一種或多種藥學上可接受的載體，其中該第一化合物係FXR激動劑，並且該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。

【0017】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係增加胰島素分泌之藥劑。在另一個實例中，該至少一種另外的治療劑係提高靶細胞、組織或器官對胰島素的敏感性之藥劑。在另一個實例中，該至少一種另外的治療劑係降低血液中葡萄糖的水平之藥劑。

【0018】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係胰島素或一胰島素類似物。在另一實例中，該胰島素或胰島素類似物選自Humulin® R、賴脯胰島素(Humalog®)、門冬胰島素(Novolog®)、谷賴胰島素(Apidra®)、速效胰島素鋅(Semilente®)、甘精胰島素(Lantus®)、地特(detemir)胰島素(Levemir®)、等項胰島素、胰島素鋅(Lente®)、長效胰島素鋅(Ultralente®)、德穀(degludec)胰島素、Exubera®以及Afrezza®。

【0019】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係胰腺β細胞中的ATP敏感性K⁺通道之抑制劑。在另一實例中，該至少一種另外的治療劑係一種磺醯脲。在另一實例中，該磺醯脲選自甲苯磺丁脲(Orinase®)、乙醯苯磺醯環己脲(迪米洛(Dymelor))、妥拉磺脲(Tolinase®)、氯磺丙脲(Diabinese®)、胺磺丁脲(Glucidoral®)、美他己脲(metahexamide)、格列吡(glipizide)(Glucotrol®)、格列本脲(glyburide)或格列本脲(glibenclamide)(Micronase®)、格吡胺(glycopyramide)、格列喹酮(gliquidone)(Glurenorm)、格列齊特(gliclazide)(Uni Diamicron)、格列波脲(glibornuride)、格列派特(glisoxepide)、格列美脲(glimepiride)(Amaryl®)以及JB253(布羅伊希哈根(Broichhagen))等人，自然通訊

第8頁，共84頁(發明說明書)

(*Nature Comm.*) 5, 商品號5116 (2014))。在另一個實例中,該至少一種另外的治療劑選自美格列奈 (meglitinide)、瑞格列奈 (repaglinide) (Prandin®)、納格列奈 (nateglinide) (Starlix®)、米格列奈 (mitiglinide) 以及利諾格列 (linoglriride)。

【0020】在一個實例中,該至少一種另外的治療劑係FFA1/ GPR40 (游離脂肪酸受體1) 之激動劑。在另一個實例中,該FFA1/ GPR40激動劑係fasiglifam。

【0021】在一個實例中,該至少一種另外的治療劑係一腸促胰島素模擬物。在另一個實例中,該腸促胰島素模擬物係一胰高血糖素樣肽-1 (GLP-1)或其GLP-1受體的激動劑。在另一個實例中,該GLP-1受體激動劑選自艾塞那肽/唾液素-4、利拉魯肽 (liraglutide)、他司魯泰 (taspoglutide)、利西拉來 (lixisenatide)、阿必魯泰 (albiglutide)、度拉糖肽 (dulaglutide)、索馬魯肽 (semaglutide)、BRX-0585 (輝瑞 (Pfizer)/比奧雷克西斯 (Biorexis)) 以及CJC-1134-PC (軛合至人白蛋白的唾液素-4)。在另一個實例中,該腸促胰島素模擬物係一抑胃肽(GIP)或GIP類似物。

【0022】在一個實例中,該至少一種另外的治療劑係二肽基肽酶-4 (DPP-4, 在本領域中還被稱為DPP-IV) 之抑制劑。在另一個實例中,該DPP-4抑制劑選自維格列汀 (vildagliptin) (Galvus®)、西他列汀 (sitagliptin) (Januvia®)、沙格列汀 (saxagliptin) (Onglyza®)、利拉利汀 (linagliptin) (Tradjenta®)、阿格列汀 (alogliptin)、塞格立汀 (sempagliflozin)、阿拉格列汀 (anagliptin)、吉格列汀 (gemigliptin)、替格列汀 (teneligliptin)、卡格列汀 (carmegliptin)、戈賽列汀 (gosogliptin)、杜拓格利普汀 (dutogliptin)、黃連素以及羽扇豆醇。

【0023】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係人過氧化物酶體增殖物活化受體（PPAR） γ 激動劑。在另一實例中，該PPAR γ 激動劑選自噻唑啉二酮類和格列酮類，例如，羅格列酮（rosiglitazone）、曲格列酮（troglitazone）、吡格列酮（pioglitazone）、恩格列酮（englitazone）、巴格列酮（balaglitazone）、來格列酮（rivoglitazone）、環格列酮（ciglitazone）、洛貝格列酮（lobeglitazone）以及萘格列酮（netoglitazone）。

【0024】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係雙胍。在另一實例中，該雙胍選自二甲雙胍、丁雙胍以及苯乙雙胍。

【0025】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係膽汁酸螯合劑。在另一個實例中，該膽汁酸螯合劑選自陰離子交換樹脂、季胺（例如，考來烯胺（cholestyramine）或考來替泊（colestipol））以及回腸膽汁酸轉運蛋白抑制劑。

【0026】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係促進葡萄糖的代謝（例如，葡萄糖的磷酸化）之藥劑。在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係一種葡萄糖激酶活化劑。在另一實例中，該葡萄糖激酶活化劑係如在WO 2000/058293中描述之化合物。

【0027】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係阻斷葡萄糖的腎重吸收之藥劑。在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係SGLT-2抑制劑。在另一實例中，該SGLT-2抑制劑選自卡格列淨（canagliflozin）、達格列淨（dapagliflozin）、恩格列淨（empagliflozin）、瑞格列淨（remogliflozin）、舍格列淨（sergliflozin）、托格列淨（tofogliflozin）、伊格列淨（ipragliflozin）以及埃格列淨（ertugliflozin）。

【0028】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係減少腸中的葡萄糖吸收之藥劑。在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係 α -葡萄糖苷酶抑制

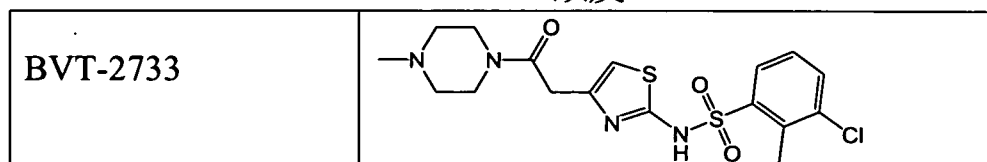
劑。在另一實例中，該 α -葡萄糖苷酶抑制劑選自米格列醇 (miglitol) (Glyset®)、阿卡波糖 (acarbose) (Precose®) 以及伏格列波糖 (voglibose)。

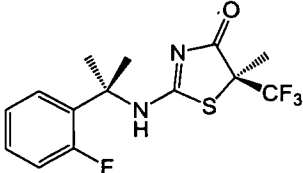
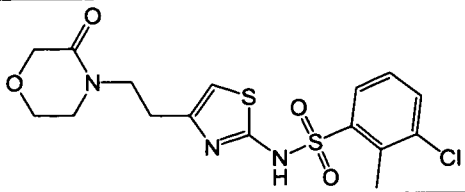
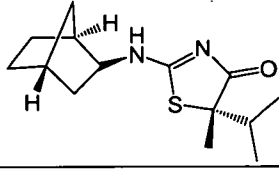
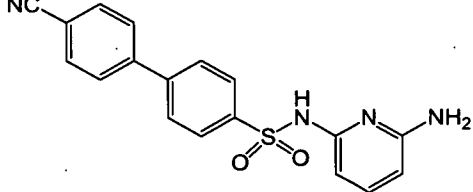
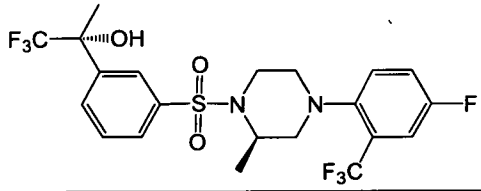
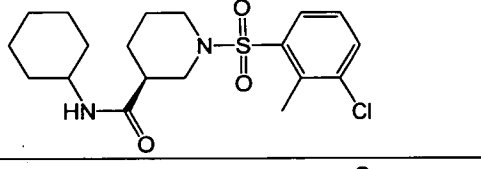
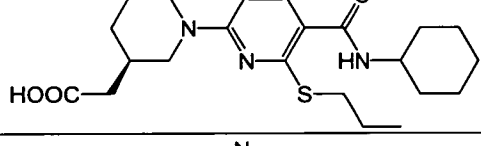
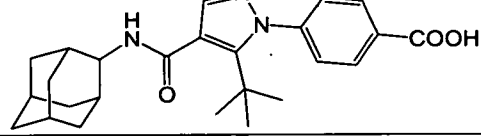
【0029】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係減慢胃排空和/或遏制胰高糖血素之藥劑。在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係澱粉不溶素或澱粉不溶素類似物。在另一實例中，該澱粉不溶素類似物係普蘭林肽 (pramlintide)。

【0030】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係微粒體甘油三酯轉移蛋白 (MTP) 抑制劑。在另一實例中，該MTP抑制劑選自咪格列唑 (midaglizole)、伊格列唑 (isaglidole)、德格列唑 (deriglidole)、咪唑克生 (idazoxan)、依法克生 (efaroxan) 以及氟洛克生 (fluparoxan)。

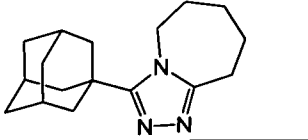
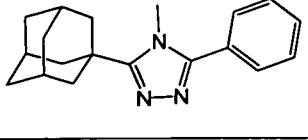
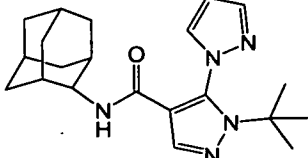
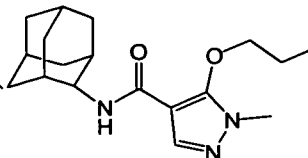
【0031】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑選自溴隱亭 (bromocriptine)、苯氟雷司 (benfluorex) 以及托瑞司他 (tolrestat)。

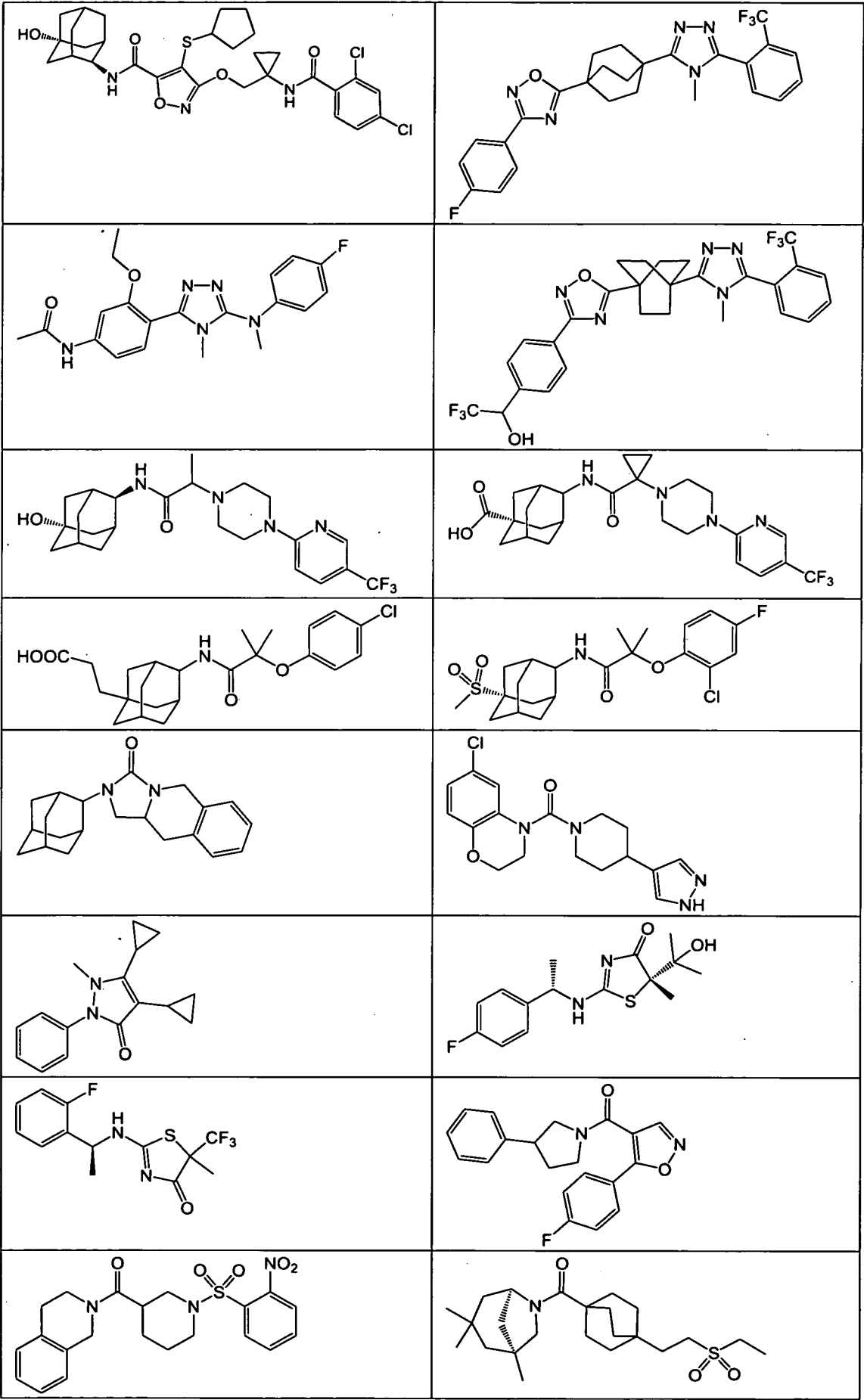
【0032】在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係降低醣皮質激素的濃度之藥劑。在一個實例中，該至少一種另外的治療劑係 11β -HSD1抑制劑。在另一實例中，該 11β -HSD1抑制劑選自甘草酸苷 (glycyrrhizic acid)、甘草酸 (glycyrrhetic acid/enoxolone)、卡本諾索隆 (carbenoxolone)、松香酸、類黃酮柚皮素 (flavonoid naringenine)、大黃素蒽醌 (anthraquinone emodin)、金剛烷基[1,2,4]三唑並[4,3-a]氮呋 (azepine)、BVT-2733、BVT-116429、BVT-3498/AMG-311、AMG-221、PF-915275、HSD-016、INCB-13739、INCB-20817、MK-0916、MK-0736、AZD-4017、AZD-8329、RG-4929、RG-7234、BMS-816336以及JTT-654，

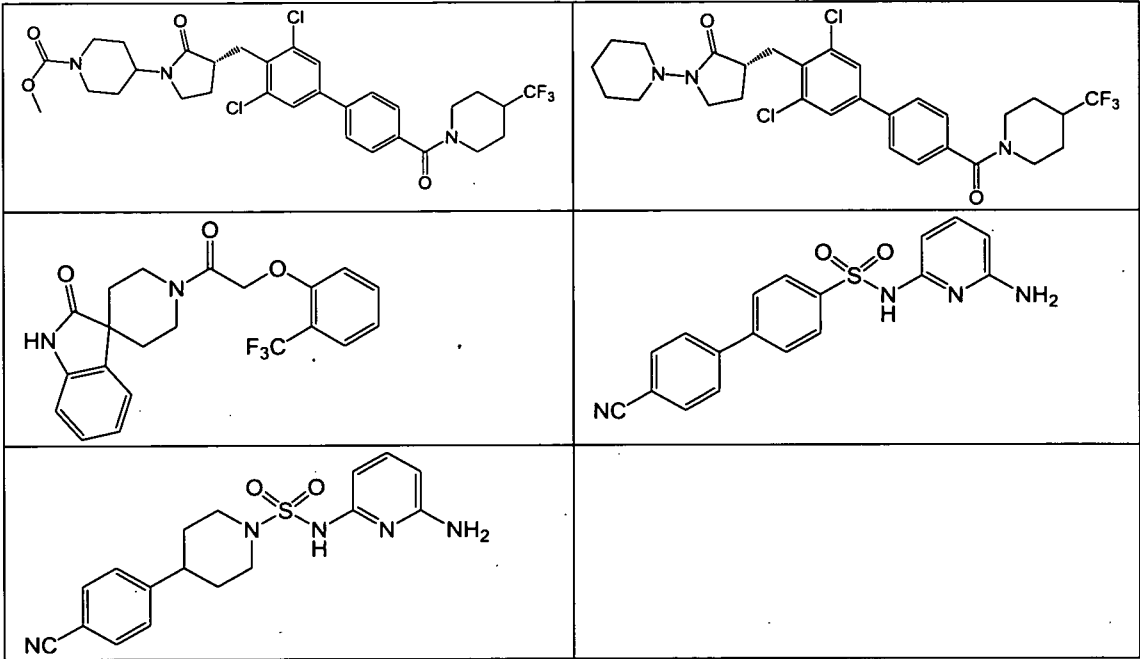


BVT-116429	
BVT-3498/AMG-311	
AMG-221	
PF-915275	
HSD-016	
INCB-13739	
AZD-4017	
AZD-8329	

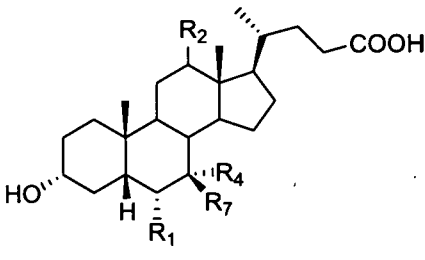
以及選自下表之化合物：





【0033】在一個實例中，該醫藥組合物的第一化合物係具有式I之化合物：



(I)，

或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軀合物，其中：

R₁係氫或未取代的C₁-C₆烷基；

R₂係氫或 α -羥基；

R₄係羥基或氫；並且

R₇係羥基或氫。

【0034】在一個實例中，R₁係未取代的C₁-C₆烷基。在另一個實例中，R₁係未取代的C₁-C₃烷基。在另一個實例中，R₁係甲基、乙基或丙基。在另一個實例中，R₁係乙基。

【0035】在一個實例中，R₂係氫。在另一個實例中，R₂係 α -羥基。

【0036】在一個實例中， R_4 係羥基且 R_7 係氫。在另一個實例中， R_4 係氫且 R_7 係羥基。

【0037】在另一個實例中， R_1 選自甲基、乙基和丙基， R_4 係羥基， R_7 係氫且 R_2 係氫。在另一個實例中， R_1 係乙基。

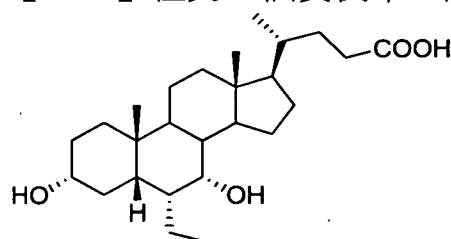
【0038】在另一個實例中， R_1 選自甲基、乙基和丙基， R_4 係氫， R_7 係羥基且 R_2 係氫。在另一個實例中， R_1 係乙基。

【0039】在另一個實例中， R_1 選自甲基、乙基和丙基， R_4 係羥基， R_7 係氫且 R_2 係 α -羥基。在另一個實例中， R_1 係乙基。

【0040】在另一個實例中， R_1 選自甲基、乙基和丙基， R_4 係氫， R_7 係羥基且 R_2 係 α -羥基。在另一個實例中， R_1 係乙基。

【0041】在一個實例中，該胺基酸軛合物係甘胺酸軛合物。在一個實例中，該胺基酸軛合物係牛磺酸軛合物。

【0042】在另一個實例中，該化合物係



(1)，

或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軛合物。

【0043】待由本申請案解決的問題之一係鑒別用於治療或預防與血液中葡萄糖的濃度升高相關的病狀（如FXR介導的疾病（例如，NAFLD和NASH）、高血糖症和糖尿病）以及用於降低血液中的葡萄糖水平、用於增加胰島素分泌以及用於提高胰島素敏感性之組合療法。例如，本申請案鑒別用於藉由降低血液中的葡萄糖水平和/或增加胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性來治療或預防FXR介導的疾病（例如，NAFLD和NASH）的組合療法。在

一個實施方式中，該疾病或病狀係藉由FXR活化治療的。雖然用於與葡萄糖水平升高相關的病狀的藥物可獲得，但該等藥物經常出於各種原因而不適合用於許多患者。例如，許多藥物具有副作用，如噁心、嘔吐、腹瀉、暈眩、頭痛以及乏力。當單獨給予時，一些藥物對於治療而言可能是不足的。例如，在一些情況下，單獨一種胰島素分泌刺激劑不足以控制存在於許多患者（例如，患有NAFLD或NASH的患者）中的高血糖症的嚴重水平。一些藥物由於廣泛代謝成無活性或效力更低的代謝物而可能需要給予高劑量或更頻繁的給予。幾種類別的治療劑（包括利拉魯肽）係經由注射給予的。經口共同給予第二治療劑的優點可以帶來減少的注射次數和/或頻率。藉由減少次數和/或頻率，治療給藥方案可以允許更高的患者依從性，尤其是對於可能不習慣注射的NASH患者來說。在此所述的組合療法能夠解決上述問題並且可以具有一種或多種以下優點：例如，協同作用、在無藥物損失功效的情況下減少每日劑量的次數、降低患者的血糖、改進的效力、選擇性、組織滲透、半衰期和/或代謝穩定性。

【0044】 在本申請案的組合物、包裝或套組（kit）、方法以及用途中，第一化合物可以是游離酸或第一化合物可以是藥學上可接受的鹽或胺基酸氈合物（例如，甘胺酸或牛磺酸氈合物）。在一個實例中，該第一化合物係任何FXR激動劑。在一方面，該第一化合物係一種具有式I之化合物。在一方面，該第一化合物係奧貝膽酸（化合物1）。在一個實例中，該第一化合物係具有式I之化合物的游離酸。在一個實例中，該第一化合物係具有式I之化合物的甘胺酸氈合物。在一個實例中，該第一化合物係具有式I之化合物的牛磺酸氈合物。

【0045】 在本申請案的組合物、包裝或套組、方法以及用途中，該至少一種另外的治療劑可以是在此所述的任何藥劑。在一個實例中，該至少一種

另外的治療劑係增加胰島素分泌之藥劑。在另一個實例中，該至少一種另外的治療劑係提高靶細胞、組織或器官對胰島素的敏感性之藥劑。在另一個實例中，該至少一種另外的治療劑係降低血液中葡萄糖的水平之藥劑。

【0046】本申請案的化合物還包含同位素標記的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物，該同位素標記的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物具有與本申請案的第一化合物（例如，具有式I之化合物）的結構相同的結構，但事實係一個或多個原子被具有與最常在自然中發現的原子質量或質量數不同的原子質量或質量數的原子置換。可以併入該第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物中的同位素的實例包括氫、碳、氮、氟的同位素，如 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 以及 ^{18}F 。

【0047】包含上述同位素和/或其他原子的其他同位素的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物在本申請案的範圍之內。同位素標記的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物，例如併入放射性同位素如 ^3H 和/或 ^{14}C 之第一化合物適用於藥物和/或底物組織分佈測定中。氚化的（即 ^3H ）和碳-14（即 ^{14}C ）同位素因其容易製備和可檢測性而使用。另外，用較重的同位素如氘（即 ^2H ）取代可以獲得源於更大的代謝穩定性（例如增加的體內半衰期和減少的劑量需求）的某些治療優點，並且因此可在一些情況下使用。同位素標記的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物總體上可以藉由進行在本申請案的方案和/或實例中揭露的程序、藉由用容易獲得的同位素標記的試劑取代非同位素標記的試劑來製備。在一個實例中，奧貝膽酸或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物未進行同位素標記。

【0048】本申請案還提供用於治療或預防疾病或病狀之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。

【0049】在一個實例中，該疾病或病狀係FXR介導的疾病或病狀。FXR介導的疾病或病狀的實例包括但不限於肝病，如膽汁淤積或非膽汁淤積疾病或病狀。在一個實施方式中，該FXR介導的疾病或病狀與FXR活化有關。膽汁淤積肝病包括但不限於，原發性膽汁性肝硬化(PBC)、原發性硬化性膽管炎(PSC)、門靜脈高壓、膽道閉鎖、膽汁酸腹瀉、由於進行性纖維化所致的肝損傷、肝纖維化以及慢性肝病。非膽汁淤積肝病或病狀包括但不限於，非酒精性脂肪肝病（NAFLD）；非酒精性脂肪性肝炎（NASH）；丙型肝炎感染；酒精性肝病；由於進行性纖維化所致的肝損傷；肝癌、胃腸癌以及膽管癌，如肝細胞癌、膽管癌、結腸直腸癌、胃癌以及腎癌；肝纖維化；由甲胺喋呤、異煙肼、酚丁（oxyphenistatin）、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或胺碘酮（amiodarone）誘導的肝病；自身免疫性肝炎；肉狀瘤病；威爾遜氏病（Wilson's disease）；血色素沈著症；高歇氏病（Gaucher's disease）；III型、IV型、VI型、IX型以及X型肝糖貯積病（glycogen storage disease）； α 1-抗胰蛋白酶缺乏症（antitrypsin deficiency）；腦肝腎綜合症（Zellweger syndrome）；酪胺酸血症（tyrosinemia）；果糖血症（fructosemia）；半乳糖血症（galactosemia）；與布-加綜合症（Budd-Chiari syndrome）、靜脈阻塞病或門靜脈血栓形成相關的血管紊亂；以及先天性肝纖維變性。可藉由FXR活化治療的疾病或病狀的實例還包括高血糖症、糖尿病、肥胖症、胰島素抗性、高脂血症、高LDL-膽固醇、高HDL-膽固醇、高甘油三酯以及心血管疾病。

【0050】NAFLD係特徵在於肝中的脂肪積聚（稱為脂肪浸潤）的醫學病狀。NAFLD係慢性肝病的最常見病因之一，並且涵蓋與肝細胞中的脂質沈積相關的一系列病狀。它在從脂肪變性（單純性脂肪肝）至非酒精性脂肪性肝炎（NASH）至晚期纖維化和肝硬化的範圍內。該疾病通常是沈默的並且

第 18 頁，共 84 頁(發明說明書)

經常是藉由偶然升高的肝酶水平而發現的。NAFLD與肥胖症和胰島素抗性密切相關並且目前被許多人認為是代謝綜合症的肝組分。

【0051】非酒精性脂肪性肝炎(NASH)係造成肝中的炎症以及脂肪和纖維(癍痕)組織積聚之病狀。血液中的肝酶水平可能比在非酒精性脂肪肝(NAFL)情況下觀察到的輕微升高更高。雖然類似的病狀可以在酗酒的人中發生，但NASH在很少喝酒至不喝酒的那些人中發生。NASH影響2%至5%的美國人，並且最頻繁地在具有一種或多種以下病狀的人中觀察到：肥胖症、糖尿病、高脂血症、胰島素抗性、某些藥劑的使用以及暴露於毒素。NASH係世界範圍內慢性肝病的日益增長的常見病因，並且與增加的肝相關死亡率和肝細胞癌相關(即使在不存在肝硬化的情況下)。NASH在15% - 20%的受影響的個體中進展至肝硬化並且現在是美國的肝移植的主要適應症之一。目前，不存在用於NASH的經批准的療法。

【0052】本申請案還提供用於治療或預防NAFLD或NASH之方法。在一個實例中，本申請案提供用於治療或預防與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關的NAFLD或NASH之方法。在一個實例中，本申請案提供用於至少部分地藉由降低血液中的葡萄糖水平和/或增加胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性來治療或預防NAFLD或NASH之方法。在一個實例中，本申請案提供用於治療或預防NASH之方法。在一個實例中，本申請案提供用於治療或預防與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關的NASH之方法。在一個實例中，本申請案提供用於至少部分地藉由降低血液中的葡萄糖水平和/或增加胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性來治療或預防NASH之方法。

【0053】在一個實例中，該疾病或病狀與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關。該疾病或病狀的實例包括但不

限於，FXR介導的疾病（例如，NAFLD和NASH）、高血糖症、糖尿病、肥胖症以及胰島素抗性。

【0054】在一個實例中，該疾病或病狀係FXR介導的疾病。在一個實例中，該疾病或病狀係NAFLD或NASH。在一個實例中，該疾病或病狀係NASH。

【0055】在一個實例中，該疾病或病狀係高血糖症、糖尿病、肥胖症或胰島素抗性。在一個實例中，該疾病或病狀係高血糖症。在一個實例中，該疾病或病狀係糖尿病。在另一實例中，糖尿病係I型糖尿病。在另一個其他實例中，糖尿病係II型糖尿病。在一個實例中，該疾病或病狀係肥胖症。在一個實例中，該疾病或病狀係胰島素抗性。

【0056】本申請案還提供用於治療或預防高血糖症、糖尿病、肥胖症或胰島素抗性之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，該受試者不患有膽汁淤積病狀。在另一個實例中，該受試者患有膽汁淤積病狀。在一個實例中，該受試者不患有肝病。在另一個實例中，該受試者患有肝病。在另一實例中，該肝病選自膽汁淤積肝病，如PBC、PSC、門靜脈高壓、膽汁酸腹瀉、由於進行性纖維化所致的肝損傷、肝纖維化以及慢性肝病。在另一實例中，該受試者患有PBC、NAFLD或NASH。在另一實例中，該受試者患有纖維化。在另一個其他實例中，該受試者患有非膽汁淤積肝病或病狀，如非酒精性脂肪肝病（NAFLD）；非酒精性脂肪性肝炎（NASH）；丙型肝炎感染；酒精性肝病；由於進行性纖維化所致的肝損傷；肝癌、胃腸癌以及膽管癌，如肝細胞癌、膽管癌、結腸直腸癌、胃癌以及腎癌；肝纖維化；由甲胺喋呤、異煙肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或胺碘酮誘導的肝病；自身免疫性肝炎；肉狀瘤病；威爾遜氏病；血色素沈著症；高歇氏病；III型、IV型、VI型、IX型以及X型肝醣貯積病； α 1-抗胰蛋白酶缺乏症；腦肝腎

綜合症；酪胺酸血症；果糖血症；半乳糖血症；與布-加綜合症、靜脈阻塞病或門靜脈血栓形成相關的血管紊亂；以及先天性肝纖維變性。

【0057】本申請案還提供用於降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，該受試者不患有膽汁淤積病狀。在另一個實例中，該受試者患有膽汁淤積病狀。在一個實例中，該受試者不患有肝病。在另一個實例中，該受試者患有肝病。在另一實例中，該肝病選自膽汁淤積肝病，如PBC、PSC、門靜脈高壓、膽汁酸腹瀉、慢性肝病、NAFLD、NASH、丙型肝炎感染、酒精性肝病、由於進行性纖維化所致的肝損傷、肝纖維化以及慢性肝病。在另一實例中，該受試者患有PBC、NAFLD或NASH。在另一個其他實例中，該受試者患有纖維化。在另一個實例中，該受試者患有非膽汁淤積肝病或病狀，如非酒精性脂肪肝病（NAFLD）；非酒精性脂肪性肝炎（NASH）；丙型肝炎感染；酒精性肝病；由於進行性纖維化所致的肝損傷；肝癌、胃腸癌以及膽管癌，如肝細胞癌、膽管癌、結腸直腸癌、胃癌以及腎癌；肝纖維化；由甲胺喋呤、異煙肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或胺碘酮誘導的肝病；自身免疫性肝炎；肉狀瘤病；威爾遜氏病；血色素沈著症；高歇氏病；III型、IV型、VI型、IX型以及X型肝糖貯積病； α 1-抗胰蛋白酶缺乏症；腦肝腎綜合症；酪胺酸血症；果糖血症；半乳糖血症；與布-加綜合症、靜脈阻塞病或門靜脈血栓形成相關的血管紊亂；以及先天性肝纖維變性。

【0058】本申請案還提供用於抑制或逆轉纖維化之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，該受試者不患有膽汁淤積病狀。在另一個實例中，該受試者患有膽汁淤積病狀。

【0059】在一個實例中，向其給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物的受試者不患有與選自下組之疾病或病狀相關之膽汁淤積病狀，該組由以下各項組成：原發性肝癌和膽管癌，如肝細胞癌、結腸直腸癌和膽管癌；轉移性癌症；敗血症；慢性全胃腸外營養；囊性纖維化；以及肉芽腫肝病。在一個實例中，有待抑制或逆轉的纖維化發生在其中表現FXR的器官中。

【0060】在一個實例中，膽汁淤積病狀被定義為具有鹼性磷酸酶、 γ -穀胺醯轉胺酶(GGT)和/或5'核苷酸酶的異常升高的血清水平。在另一個實例中，膽汁淤積病狀被進一步定義為呈現至少一種臨床症狀。在一個實例中，該症狀係發癢（瘙癢）。在另一個實例中，膽汁淤積病狀選自由以下各項組成之群組：原發性膽汁性肝硬化(PBC)、原發性硬化性膽管炎(PSC)、藥物誘導的膽汁淤積、遺傳性膽汁淤積以及妊娠肝內膽汁淤積症。

【0061】在一個實例中，纖維化選自由以下各項組成之群組：肝纖維化、腎纖維化以及腸纖維化。

【0062】在一個實例中，向其給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物的受試者患有與選自下組的疾病相關的肝纖維化，該組由以下各項組成：乙型肝炎；丙型肝炎；寄生蟲性肝病；移植後細菌、病毒和真菌感染；酒精性肝病（ALD）；非酒精性脂肪肝病（NAFLD）；非酒精性脂肪性肝炎（NASH）；由甲胺喋呤、異煙肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或胺碘酮誘導的肝病；自身免疫性肝炎；肉狀瘤病；威爾遜氏病；血色素沈著症；高歇氏病；III型、IV型、VI型、IX型以及X型肝糖貯積病； α_1 -抗胰蛋白酶缺乏症；腦肝腎綜合症；酪胺酸血症；果糖血症；半乳糖血症；與布-加綜合症、靜脈阻塞病或門靜脈血栓形成相關的血管紊亂；以及先天性肝纖維變性。

【0063】在另一個實例中，該受試者患有與選自下組的疾病相關的腸纖維化，該組由以下各項組成：克羅恩病（Crohn's disease）、潰瘍性結腸炎、放射後結腸炎以及顯微鏡下結腸炎。

【0064】在另一個實例中，該受試者患有與選自下組之疾病相關的腎纖維化，該組由以下各項組成：糖尿病性腎病、高血壓性腎硬化、慢性腎小球性腎炎、慢性移植腎小球病、慢性間質性腎炎以及多囊性腎病。

【0065】在另一個實例中，向其給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物的受試者患有與選自下組之疾病相關的腸纖維化，該組由以下各項組成：克羅恩病、潰瘍性結腸炎、放射後結腸炎以及顯微鏡下結腸炎。

【0066】在另一個實例中，向其給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物的受試者患有與選自下組之疾病相關的腎纖維化，該組由以下各項組成：糖尿病性腎病、高血壓性腎硬化、慢性腎小球性腎炎、慢性移植腎小球病、慢性間質性腎炎以及多囊性腎病。

【0067】本申請案還提供一種用於減少血清膽紅素和/或一種或多種肝酶的量的方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。

【0068】在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案之組合物的受試者），本申請案的方法使血清膽紅素的量減少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一名健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的膽紅素水平。在一個實例中，本申請案的方法使膽紅素的水平降低到一正常水平（例如，類似於無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體中的膽紅素的水平）。在另一實例中，本申請案之方法使膽紅素的水平降低到10 mg/L、9 mg/L、8 mg/L、7 mg/L、6 mg/L、5 mg/L、4 mg/L、

第 23 頁，共 84 頁(發明說明書)

3 mg/L、2 mg/L、1.5 mg/L、1.2 mg/L或1 mg/L以下。在另一實例中，本申請案的方法使膽紅素的水平降低到2 mg/L、1.5 mg/L、1.2 mg/L或1 mg/L以下。

【0069】在一個實例中，肝酶選自由以下各項組成之群組：鹼性磷酸酶（ALP、AP或Alk Phos）、丙胺酸胺基轉移酶（ALT）、天冬胺酸胺基轉移酶（AST）、 γ -穀胺醯轉胺酶（GGT）、乳酸脫氫酶（LDH）以及5'核苷酸酶。在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案的組合物的受試者），本申請案的方法使一種或多種肝酶的量減少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的一種或多種肝酶水平。在一個實例中，本申請案的方法使一種或多種肝酶（例如，ALP、ALT、AST、GGT、LDH以及5'核苷酸酶）的水平降低到一正常水平（例如，類似於無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體中的肝酶的水平）。

【0070】在另一實例中，本申請案之方法使ALP的血清水平降低到500 IU/L（國際單位/升）、400 IU/L、300 IU/L、200 IU/L、180 IU/L、160 IU/L或150 IU/L以下。在另一實例中，本申請案之方法使ALP的水平降低到從約40 IU/L至約150 IU/L。

【0071】在另一實例中，本申請案之方法使ALT的水平降低到200 IU/L（國際單位/升）、150 IU/L、100 IU/L、80 IU/L、60 IU/L或50 IU/L以下。在另一實例中，本申請案之方法使ALT的水平降低到從約5 IU/L至約50 IU/L。

【0072】在另一實例中，本申請案之方法使AST的水平降低到200 IU/L（國際單位/升）、150 IU/L、100 IU/L、80 IU/L、60 IU/L、50 IU/L或40 IU/L以

下。在另一實例中，本申請案之方法使AST的水平降低到從約10 IU/L至約50 IU/L。

【0073】在另一實例中，本申請案之方法使GGT的水平降低到200 IU/L（國際單位/升）、150 IU/L、100 IU/L、90 IU/L、80 IU/L、70 IU/L或60 IU/L以下。在另一實例中，本申請案的方法使GGT的水平降低到從約15 IU/L至約50 IU/L或從約5 IU/L至約30 IU/L。

【0074】在另一實例中，本申請案之方法使LDH的水平降低到500 IU/L（國際單位/升）、400 IU/L、300 IU/L、200 IU/L、180 IU/L、160 IU/L、150 IU/L、140 IU/L或130 IU/L以下。在另一實例中，本申請案的方法使LDH的水平降低到從約120 IU/L至約220 IU/L。

【0075】在另一實例中，本申請案之方法使5'核苷酸酶的水平降低到50 IU/L（國際單位/升）、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或5 IU/L以下。在另一實例中，本申請案的方法使5'核苷酸酶的水平降低到從約2 IU/L至約15 IU/L。

【0076】本申請案還提供一用於降低（如血液中的）葡萄糖水平（即葡萄糖的量）之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案的組合物的受試者），該方法使餐後葡萄糖水平降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的餐後葡萄糖水平。在一個實例中，本申請案之方法使餐後葡萄糖水平降低到正常水平（例如，類似於無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體中的葡萄糖水平）。在一個實例中，相較於一對照受試者（例

如，未給予本申請案的組合物的受試者），該方法使空腹葡萄糖水平降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的空腹葡萄糖水平。在一個實例中，本申請案的方法使空腹葡萄糖水平降低到正常水平（例如，類似於無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體中的葡萄糖水平）。

【0077】在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的葡萄糖水平。在一個實例中，本申請案之方法使餐後葡萄糖水平降低到800 mg/L、700 mg/L、600 mg/L、500 mg/L、400 mg/L、350 mg/L、300 mg/L、250 mg/L、240 mg/L、230 mg/L、220 mg/L、210 mg/L、200 mg/L、190 mg/L、180 mg/L、170 mg/L、160 mg/L或150 mg/L以下。在一個實例中，本申請案之方法使餐後葡萄糖水平降低到200 mg/L、190 mg/L、180 mg/L、170 mg/L、160 mg/L或150 mg/L以下。在一個實例中，本申請案之方法使空腹葡萄糖水平降低到70-800 mg/L、70-700 mg/L、70-600 mg/L、70-500 mg/L、70-400 mg/L、70-350 mg/L、70-300 mg/L、70-250 mg/L、70-240 mg/L、70-230 mg/L、70-220 mg/L、70-210 mg/L、70-200 mg/L、70-190 mg/L、70-180 mg/L、70-170 mg/L、70-160 mg/L、70-150 mg/L、70-140 mg/L、70-130 mg/L、70-120 mg/L、70-110 mg/L、70-100 mg/L、90-130 mg/L、90-120 mg/L、90-110 mg/L或90-100 mg/L。在一個實例中，本申請案之方法使餐後葡萄糖水平降低到70-200 mg/L、70-190 mg/L、70-180 mg/L、70-170 mg/L、70-160 mg/L、70-150 mg/L、70-140 mg/L、70-130 mg/L、70-120 mg/L、70-110 mg/L、70-100 mg/L、90-130 mg/L、90-120 mg/L、90-110 mg/L或90-100 mg/L。

【0078】本申請案還提供一用於降低（如血液中的）血紅蛋白A1c（HbA1c）水平（即HbA1c的量）之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案的組合物的受試者），該方法使HbA1c水平降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的HbA1c水平。在一個實例中，本申請案的方法使HbA1c水平降低到正常水平（例如，類似於無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體中的HbA1c水平）。

【0079】在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有升高的HbA1c水平。在一個實例中，本申請案之方法使HbA1c水平降低到10%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.4%、6.3%、6.2%、6.1%、6.0%、5.9%、5.8%或5.7%以下。在一個實例中，本申請案之方法使HbA1c水平降低到8.0%、7.9%、7.8%、7.7%、7.6%、7.5%、7.4%、7.3%、7.2%、7.1%、7.0%、6.9%、6.8%、6.7%、6.6%、6.5%、6.4%、6.3%、6.2%、6.1%、6.0%、5.9%、5.8%或5.7%以下。在一個實例中，本申請案之方法使HbA1c水平降低到6.5%、6.4%、6.3%、6.2%、6.1%、6.0%、5.9%、5.8%或5.7%以下。

【0080】本申請案還提供一用於增加胰島素分泌（即胰島素的量）之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案的組合物的受試者），本申請案之方法使胰島素分泌增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有減少的

胰島素分泌。在一個實例中，本申請案之方法增加胰島素分泌，以使得胰島素水平係2-9.0 mIU/mL、2-8.9 mIU/mL、2-8.8 mIU/mL、2-8.7 mIU/mL、2-8.6 mIU/mL、2-8.5 mIU/mL、2-8.4 mIU/mL、2-8.3 mIU/mL、2-8.2 mIU/mL、2-8.1 mIU/mL、2-8.0 mIU/mL、2-7.9 mIU/mL、2-7.8 mIU/mL、2-7.7 mIU/mL、2-7.6 mIU/mL、2-7.5 mIU/mL、2-7.4 mIU/mL、2-7.3 mIU/mL、2-7.2 mIU/mL、2-7.1 mIU/mL、2-7.0 mIU/mL、2-6.9 mIU/mL、2-6.8 mIU/mL、2-6.7 mIU/mL、2-6.6 mIU/mL、2-6.5 mIU/mL、2-6.4 mIU/mL、2-6.3 mIU/mL、2-6.2 mIU/mL、2-6.1 mIU/mL、2-6.0 mIU/mL、3-9.0 mIU/mL、3-8.9 mIU/mL、3-8.8 mIU/mL、3-8.7 mIU/mL、3-8.6 mIU/mL、3-8.5 mIU/mL、3-8.4 mIU/mL、3-8.3 mIU/mL、3-8.2 mIU/mL、3-8.1 mIU/mL、3-8.0 mIU/mL、3-7.9 mIU/mL、3-7.8 mIU/mL、3-7.7 mIU/mL、3-7.6 mIU/mL、3-7.5 mIU/mL、3-7.4 mIU/mL、3-7.3 mIU/mL、3-7.2 mIU/mL、3-7.1 mIU/mL、3-7.0 mIU/mL、3-6.9 mIU/mL、3-6.8 mIU/mL、3-6.7 mIU/mL、3-6.6 mIU/mL、3-6.5 mIU/mL、3-6.4 mIU/mL、3-6.3 mIU/mL、3-6.2 mIU/mL、3-6.1 mIU/mL、3-6.0 mIU/mL、4-9.0 mIU/mL、4-8.9 mIU/mL、4-8.8 mIU/mL、4-8.7 mIU/mL、4-8.6 mIU/mL、4-8.5 mIU/mL、4-8.4 mIU/mL、4-8.3 mIU/mL、4-8.2 mIU/mL、4-8.1 mIU/mL、4-8.0 mIU/mL、4-7.9 mIU/mL、4-7.8 mIU/mL、4-7.7 mIU/mL、4-7.6 mIU/mL、4-7.5 mIU/mL、4-7.4 mIU/mL、4-7.3 mIU/mL、4-7.2 mIU/mL、4-7.1 mIU/mL、4-7.0 mIU/mL、4-6.9 mIU/mL、4-6.8 mIU/mL、4-6.7 mIU/mL、4-6.6 mIU/mL、4-6.5 mIU/mL、4-6.4 mIU/mL、4-6.3 mIU/mL、4-6.2 mIU/mL、4-6.1 mIU/mL、4-6.0 mIU/mL、5-9.0 mIU/mL、5-8.9 mIU/mL、5-8.8 mIU/mL、5-8.7 mIU/mL、5-8.6 mIU/mL、5-8.5 mIU/mL、5-8.4 mIU/mL、5-8.3 mIU/mL、5-8.2 mIU/mL、5-8.1 mIU/mL、5-8.0 mIU/mL、5-7.9 mIU/mL、5-7.8 mIU/mL、5-7.7 mIU/mL、5-7.6 mIU/mL、5-7.5 mIU/mL、5-7.4 mIU/mL、5-7.3 mIU/mL、5-7.2 mIU/mL、5-7.1 mIU/mL、5-7.0 mIU/mL、

5-6.9 mIU/mL、5-6.8 mIU/mL、5-6.7 mIU/mL、5-6.6 mIU/mL、5-6.5 mIU/mL、5-6.4 mIU/mL、5-6.3 mIU/mL、5-6.2 mIU/mL、5-6.1 mIU/mL或5-6.0 mIU/mL。

【0081】本申請案還提供一用於提高胰島素敏感性（即降低胰島素抗性）之方法，該方法包括向有需要的受試者給予治療有效量的本申請案之醫藥組合物。在一個實例中，相較於一對照受試者（例如，未給予本申請案的組合物的受試者），本申請案之方法使胰島素敏感性提高（即降低胰島素抗性）至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一個實例中，相較於一健康受試者（例如，無疾病或病狀（如在此所述的那些）的個體），該受試者具有降低的胰島素敏感性（即，提高的胰島素抗性）。

【0082】胰島素敏感性係指身體對胰島素的作用的敏感程度。據稱為胰島素敏感的人將需要比具有低敏感性的某人更少量的胰島素來降低血糖水平。

【0083】胰島素抗性（IR）係其中細胞、組織或器官未能對胰島素的正常作用有反應的生理病狀。因此，身體中的細胞組織或器官變得對胰島素抗性並且不能如正常細胞、組織或器官（例如，健康受試者中的細胞、組織或器官）一樣有效地使用胰島素。

【0084】在一個實例中，受試者係哺乳動物。在一個實例中，該哺乳動物係人。

【0085】在一個實例中，該第一化合物和一另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以雙向組合方式給予。在另一個實例中，該第一化合物和兩種或更多種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以雙向組合方式給予。

【0086】該第一化合物連同該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）可以實現協同作用，如可能對單獨療法具有抗性的葡萄糖水平、HbA1c水平和/或胰島素抗性的協同降低。因此，該第一化合物與該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）之組合係有利的。該第一化合物與該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）的這樣一種組合提供在被設計為提高依從性且因此提高有效性的具有藥學上可接受的載體的單一醫藥組合物（如呈單一膠囊形式）中可以是特別有利的。因此，本申請案進一步提供一醫藥組合物，該醫藥組合物包含有效量的第一化合物和有效量的至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）連同一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑、佐劑或賦形劑。

【0087】在一個實例中，該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）係同時給予的。例如，該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）一起在具有藥學上可接受的載體的單一醫藥組合物中給予。在另一個實例中，該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）係依序給予的。例如，該第一化合物在該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）之前或之後給予。

【0088】在一個實例中，以一第一劑量給予該第一化合物持續一第一時間段，接著以一第二劑量給予該第一化合物持續一第二時間段。在一個實例中，一第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軀合物以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或5-25 mg的一個每日總量給予持續一第一時間段，接著以0.1-1500 mg、0.2-1200 mg、

第 30 頁，共 84 頁(發明說明書)

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或5-25 mg的一個每日總量給予該第二化合物。在一個實例中，一天一次口服給予該總量。在一個實例中，該第一劑量與該第二劑量不同。在另一實例中，該第一劑量低於該第二劑量。在另一個實例中，該第一劑量高於該第二劑量。在一個實例中，該第一劑量係約5 mg（例如，從4.8 mg至5.2 mg），並且該第二劑量係約10 mg（例如，從9.8 mg至10.2 mg）。在一個實例中，該第一時間段係約6個月。在一個實例中，該第二時間段係約6個月。

【0089】在一個實例中，該醫藥組合物係口服、胃腸外或局部給予的。在另一個實例中，該醫藥組合物係口服給予的。

【0090】根據本申請案之組合物將典型地包含足夠的第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸銨合物、至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑），以便允許各自的所希望的每日劑量以單一單位劑型（如片劑或膠囊）或以同時或在一天過程中的間隔時間給予的兩個或更多個單位劑型給予至有需要的受試者。

【0091】在本申請案之方法中，活性物質可以按單次每日劑量或按每天兩個、三個、四個或更多個相同或不同的分次劑量給予，並且該等劑量可以同時或在一天過程中的不同時間給予。通常，該等活性物質將同時給予，更通常呈單一組合劑型形式。

【0092】在一方面，該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以與它們在對應單一療法中給予的劑量基本上相同的劑量給予。在一方面，該第一化合物以小於（例如，小於90%、小於80%、小於70%、小於60%、小於50%、小於40%、小於30%、小於20%或小於10%）其單一療法劑量的劑量給予。在一方面，該至少一種另外的治

療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以小於（例如，小於90%、小於80%、小於70%、小於60%、小於50%、小於40%、小於30%、小於20%或小於10%）其單一療法劑量的劑量給予。在一方面，該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）兩者均以小於（例如，小於90%、小於80%、小於70%、小於60%、小於50%、小於40%、小於30%、小於20%或小於10%）其對應單一療法劑量的一個劑量給予。

【0093】 本申請案之醫藥組合物可以呈用於口服給藥的任何方便的形式，如片劑、膠囊、粉末、錠劑、丸劑、糖錠劑、酏劑、凍乾粉末、溶液、顆粒劑、混懸液、乳劑、糖漿劑或酏劑。還可製備緩釋或延遲釋放形式，例如呈包衣顆粒、多層片劑、膠囊內膠囊、膠囊內片劑或微粒劑形式。

【0094】 用於口服給藥的固體形式可以含有藥學上可接受的黏合劑、甜味劑、崩解劑、稀釋劑、調味劑、包覆劑、防腐劑、潤滑劑和/或延時劑。適合的黏合劑包括阿拉伯膠、明膠、玉米澱粉、黃蓍膠、藻酸鈉、羧甲基纖維素或聚乙二醇。適合的甜味劑包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、阿斯巴甜或糖精。適合的崩解劑包括玉米澱粉、甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、黃原膠、膨潤土、藻酸或瓊脂。適合的稀釋劑包括乳糖、山梨醇、甘露醇、右旋糖、高嶺土、纖維素、碳酸鈣、矽酸鈣或磷酸二鈣。適合的調味劑包括薄荷油、冬青油、櫻桃、橙或覆盆子調味劑。適合的包覆劑包括丙烯酸和/或甲基丙烯酸和/或其酯的聚合物或共聚物、蠟、脂肪醇、玉米蛋白、蟲膠或穀蛋白。適合的防腐劑包括苯甲酸鈉、維生素E、 α -生育酚、抗壞血酸、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯或亞硫酸氫鈉。適合的潤滑劑包括硬脂酸鎂、硬脂酸、油酸鈉、氯化鈉或滑石。適合的延時劑包括單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

【0095】除了上述藥劑以外，用於口服施用的液體形式還可含有液體載體。適合的液體載體包括水、油如橄欖油、花生油、芝麻油、葵花油、紅花油、花生油、椰子油、液體石蠟、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、乙醇、丙醇、異丙醇、甘油、脂肪醇、甘油三酯或其混合物。

【0096】用於口服施用的懸浮液還可包含分散劑和/或懸浮劑。適合的懸浮劑包括羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、藻酸鈉或鯨蠟醇。適合的分散劑包括卵磷脂，脂肪酸如硬脂酸的聚氧乙烯酯，聚氧乙烯山梨醇單-或二-油酸酯、-硬脂酸酯或-月桂酸酯，聚氧乙烯脫水山梨醇單-或二-油酸酯、-硬脂酸酯或-月桂酸酯等。

【0097】用於口服施用的乳液還可包含一種或多種乳化劑。適合的乳化劑包括如上文例舉的分散劑或天然樹膠，如阿拉伯膠或黃蓍膠。

【0098】本申請案之醫藥組合物可以藉由摻混、研磨、均質化、懸浮、溶解、乳化、分散和/或混合該第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍合物以及至少一種另外的治療劑、連同選定的一種或多種賦形劑、一種或多種載體、一種或多種佐劑和/或一種或多種稀釋劑來製備。本申請案的呈片劑或膠囊形式之類型的醫藥組合物可以藉由以下方式來製備(a)製備一第一片劑，該第一片劑包含選自該第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍合物的活性物質中的至少一種以及至少一種另外的治療劑、連同任何所希望的一種或多種賦形劑、一種或多種載體、一種或多種佐劑和/或一種或多種稀釋劑；並且(b)製備一第二片劑或一個膠囊，其中該第二片劑或該膠囊包含剩餘的一種或多種活性物質和該第一片劑。本申請案的呈片劑或膠囊形式之類型的醫藥組合物可以藉由以下方式來製備(a)製備一第一片劑，該第一片劑包含選自該第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍合物的活性物質中的至少一種以及至少一種另外的治療劑、連同任何所希

望的一種或多種賦形劑、一種或多種載體、一種或多種佐劑和/或一種或多種稀釋劑；並且(b)製備一第二片劑或一膠囊，其中該第二片劑或該膠囊包含剩餘的一種或多種活性物質和該第一片劑。本申請案的呈片劑形式的另一類型的醫藥組合物可以藉由以下方式來製備(a)製備一膠囊，該膠囊包含選自一第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軛合物的活性物質中的至少一種以及至少一種另外的治療劑、連同任何所希望的一種或多種賦形劑、一種或多種載體、一種或多種佐劑和/或一種或多種稀釋劑；並且(b)製備一片劑，其中該片劑包含剩餘的一種或多種活性物質和該膠囊。

【0099】在多個實例中，該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）用作一立即釋放片劑抑或用作持續釋放片劑。當提供在持續釋放片劑中時它係特別有效的。各種另外的治療劑的持續釋放片劑係可商購的。片劑呈持續釋放形式的延長作用係較佳的。

【0100】在另一個實例中，本申請案之醫藥組合物包括在含有一第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸軛合物的膠囊內含有至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）之膠囊。典型地，在這種形式中，該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以立即釋放形式呈現。在該事件中，通常每日給予該組合物三次。另一種給藥方式係每日兩次提供呈持續釋放形式抑或非持續釋放形式（如上所述）的含有至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）之組合物，其中所給予的該組合物的每日量包含足夠量的活性物質以便向患者提供所希望的每日劑量。

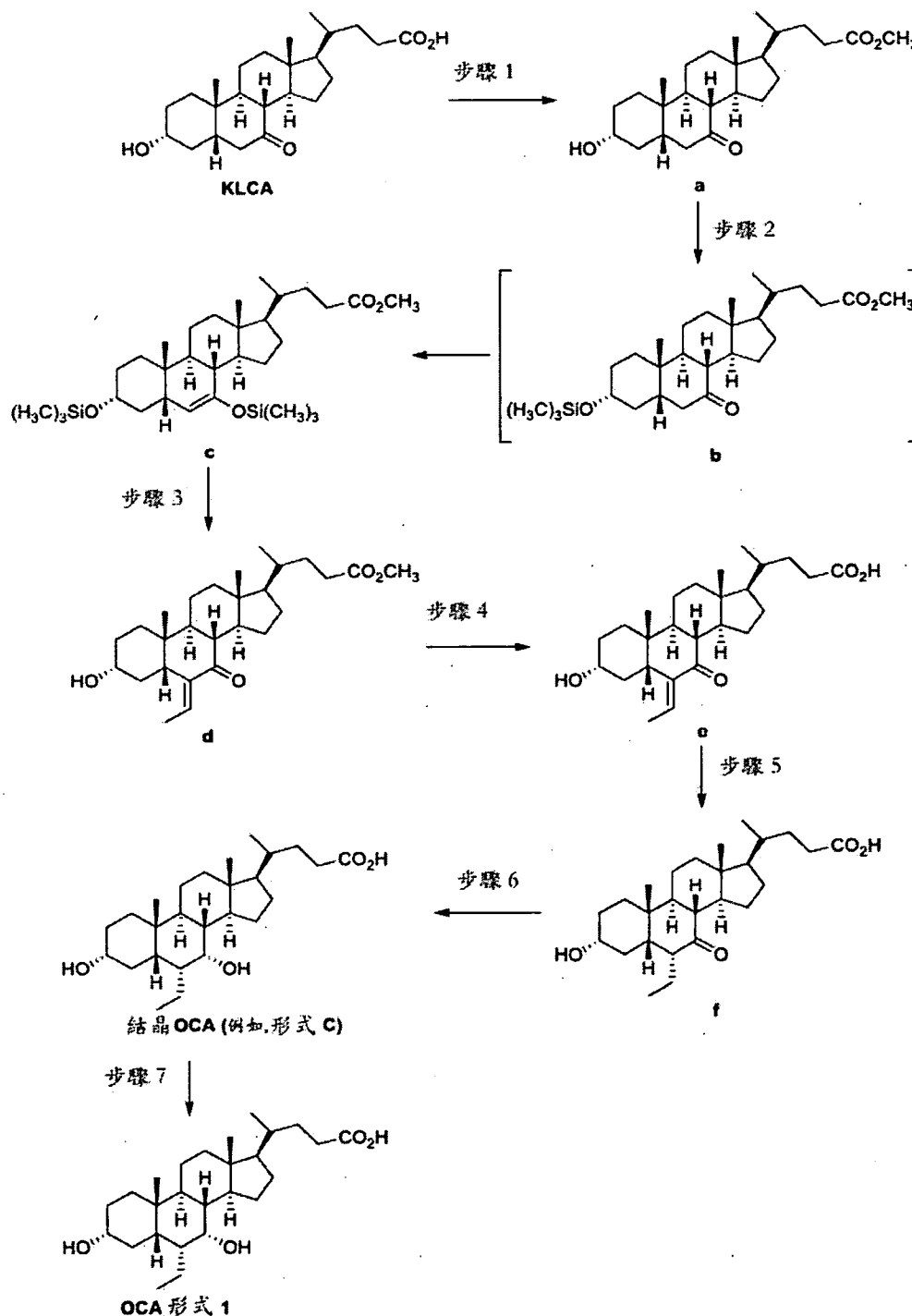
【0101】在一個實例中，本申請案之醫藥組合物係一劑型，該劑型包含每日總量為0.1-1500 mg、0.2-1200 mg、0.3-1000 mg、0.4-800 mg、0.5-600 mg、0.6-500 mg、0.7-400 mg、0.8-300 mg、1-200 mg、1-100 mg、1-50 mg、1-30

mg、4-26 mg或5-25 mg的一第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物。

【0102】本申請案之醫藥組合物可以由患者終身使用並且延長生存期。血液中的葡萄糖減少、胰島素分泌增加和/或胰島素抗性降低確保相關疾病（如糖尿病和肥胖症）的發展減少。該第一化合物和該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）的組合可能是用於伴隨高血糖症的原發性膽汁性肝硬化（PBC）和用於耐藥性原發性膽汁性肝硬化（PBC）的治療選擇。由於由本申請案提供的簡化給藥，本申請案的一組合療法可以取決於患者的體重和臨床反應以增加的劑量使用。

【0103】在此揭露的第一化合物可以藉由常規方法（例如，在美國公開號2009/0062526、美國專利號7,138,390和WO 2006/122977中描述的那些），如藉由6步合成、接著純化步驟來製備，以產生高純化合物1（奧貝膽酸或OCA），如以下方案1中所示。

方案1



【0104】以上方法描述於WO 2013/192097中，該專利的內容藉由引用以其全部內容結合在此。該方法係6步合成、接著純化步驟。步驟1係在酸催化和熱量存在下使用甲醇進行7-酮基石膽酸 (KLCA) 的C-24羧酸的酯化以便

產生甲酯化合物a。步驟2係使用一強鹼從化合物1形成矽基烯醇醚、接著用氯矽烷處理以便產生化合物c。步驟3係矽基烯醇醚化合物c與乙醛的醛醇縮合反應以便產生化合物d。步驟4係化合物d的C-24甲酯的皂化以便產生化合物e。步驟5係化合物e的6-亞乙基部分的氫化以便產生化合物f。步驟6係將化合物f的7-酮基基團選擇性還原為7 α -羥基基團以便產生結晶化合物1。步驟7係結晶化合物轉化為化合物1（奧貝膽酸形式1或OCA形式1）。

【0105】本申請案之醫藥組合物的生物活性和/或治療活性可以藉由本領域中已知的常規方法來測量。在不限制本申請案之揭露內容情況下，在此提供一些適合的方法。

肝細胞的分離

【0106】兩步原位膠原酶灌注方法可以用於分離肝細胞。肝細胞係從一適合的動物（例如，小鼠、大鼠、兔、豬）分離的。在適當灌注之後，將肝解剖並且轉移至灌注緩衝液。將所得細胞懸浮液過濾且收集。分離肝細胞（例如，藉由使用珀可（Percoll）密度離心技術）。

肝細胞的夾層培養

【0107】將分離的肝細胞在塗覆膠原的組織培養板上培養，並且維持在補充有血清、青黴素、鏈黴素、表皮生長因子、胰島素、胰高血糖素以及氫化可體松的培養基中。對於夾層系統，將另外的膠原凝膠溶液分佈在細胞上。將該等培養板在37°C下培養以便允許第二凝膠層的凝膠化和附著。將培養基每天更換並且儲存在-20°C下以用於進一步分析。將本申請案之醫藥組合物施加到肝細胞，並且隨後測量對細胞的作用。

肝細胞懸浮培養物

【0108】在分離之後立即將肝細胞洗滌且再懸浮。將懸浮的細胞在本申請案之醫藥組合物存在或不存在下進行培養。可以包括陽性對照（例如，在胰高血糖素存在下培養的細胞）。

【0109】在培養期之後，將測定釋放到培養基中的葡萄糖（例如，用葡萄糖-氧化酶方法，使用特林德（Trinder）測定套組（西格瑪（Sigma）））。

【0110】此外，葡萄糖利用可以被測定為在[5-³H]-葡萄糖存在下培養肝細胞之後氘化水（就脂肪酸氧化實驗而言）的產生。在有或無胰島素的情況下測定2-[³H]-去氧葡萄糖的攝取（佩爾多莫（Perdomo）等人，生物化學雜誌（*J. Biol. Chem.*）279，27177（2004））。D-[¹⁴C]-葡萄糖併入肝醣可以在胰島素不存在或存在下進行測量（佩爾多莫等人2004）。

HepG2細胞培養

【0111】將人肝母細胞瘤細胞（HepG2）在如所述的培養基中生長（王（Wang）等人，分子內分泌學（*Mol. Endocrinol.*）22，1622（2008））。第二天，將細胞用本申請案之醫藥組合物處理。在處理之後，將細胞用TPA、LPS或TNF- α 進行處理，並且然後收集用於RNA分離。

【0112】將進行HepG2細胞的暫態轉染（例如，藉由使用Lipofectamine 2000（英傑公司（Invitrogen）），卡爾斯巴德（Carlsbad），加利福尼亞州（CA））。在轉染後二十四小時，將細胞用本申請案之醫藥組合物預處理。隨後用或不用LPS或TPA處理細胞。然後收獲細胞並且將使用雙螢光素酶報告基因測定系統來測定螢光素酶活性。

小鼠模型

【0113】將小鼠（例如，野生型或FXR^{-/-}）在標準12：12-小時光照/黑暗循環下維持在無病原體的動物設施中。將小鼠飼餵標準齧齒動物食物並隨意飲水。將小鼠禁食過夜，並且然後腹膜內注射單劑量的LPS或磷酸鹽緩衝

鹽水（PBS）或本申請案之醫藥組合物，接著隨意給水。在注射之後，將小鼠殺死，並且除去血液和肝以用於進一步分析。所有程序遵循美國國立衛生研究院實驗室動物的護理和使用指南。

MetS兔模型

【0114】如先前所描述獲得MetS的HFD誘導的兔模型（菲利皮（Filippi）等人，性醫學雜誌（*J. Sexual Med.*）6，3274（2009））。雄性紐西蘭白兔被隨機編號並分配到兩個不同的組：未處理組，飼餵對照飲食（CON）；或處理組，飼餵HFD（例如，0.5%膽固醇和4%花生油），持續12週。將HFD兔亞組用本申請案之醫藥組合物處理。

【0115】在基線和第12週時獲得血液樣品。在處理12週之後，將兔殺死，並且切除肝、VAT（積聚在腸彎與腸系膜之間），以及膽囊的試樣並稱重、收集和加工以用於隨後分析。還對來自所有兔組的VAT樣品進行加工以用於分離前脂肪細胞。如先前所述進行生物化學和激素血清分析（菲利皮等人2009，莫雷利（Morelli）等人，類固醇生物化學和分子生物學雜誌（*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*）132，80（2012），Vignozzi等人，內分泌學雜誌（*J. Endocrinology*）212，71（2012））。

【0116】為了評價MetS的作用，設計了將以下因素中的一個或多個的存在作為虛變數考慮在內的演算法：高血糖症、高甘油三酯水平、高膽固醇水平、血壓升高以及內臟脂肪積聚。每個因素的截斷值藉由所分析參數的平均值 ± 2 S.D.導出，如在CON兔中所測量。三個或更多個因素的陽性指示MetS。

VAT的組織形態測量分析

【0117】將VAT試樣藉由蘇木精和曙紅染色進行分析以便測量脂肪細胞直徑，如先前所描述（馬內斯基（Maneschi）等人2012）。

第 39 頁，共 84 頁(發明說明書)

低氧檢測和免疫組織化學

【0118】在殺死之前使用腹膜內注射的生物還原藥物鹽酸哌莫硝唑（pimonidazole）分析VAT氧合，如先前所描述(馬內斯基等人2012，莫雷利等人2012，2013，Vignozzi等人2012)。

總部分和膜/細胞溶質部分的製備

【0119】對於來自VAT樣品的蛋白質提取，將冷凍的組織在液氮中研磨並分成兩個等分部分：一個用於總蛋白質提取並且另一個用於膜/細胞溶質製劑。製備膜和細胞溶質部分。用BCA試劑（皮爾斯（Pierce），羅克福德（Rockford），伊利諾州（IL），美國）定量蛋白質提取物，並且藉由SDS - PAGE解析。如先前所描述進行西方墨點法分析（馬內斯基等人2012）。

肝組織學

【0120】肝脂肪變性係藉由肝切片的油紅O染色評定的。將冷凍切片在低溫恆溫器中切割且固定並用油紅O染色。在油紅O染色之後，將切片洗滌並用蘇木精和曙紅染色以便突出顯示肝細胞核。最後，對切片進行拍照，並且使用Adobe Photoshop軟體在背景減除之後進行油紅O陽性的電腦輔助定量。

肝切片中的炎症標誌物的免疫組織化學

【0121】將肝切片與針對各種炎症標誌物（例如，TNF α 、Cd68、Il-6、Il-1b以及Il-12）的第一抗體一起培養。將該等切片漂洗並且與一種生物素化的第二抗體一起培養，且然後與鏈黴素-生物素-過氧化物酶複合物一起培養。將反應產物用3',3'-二胺基聯苯胺四鹽酸鹽作為發色團（西格瑪-奧德里奇（Sigma-Aldrich）公司）顯影。藉由省略第一抗體進行對照實驗。使用Adobe Photoshop軟體在背景減除之後進行針對炎症標誌物的染色的電腦輔助定量。

兔內臟脂肪前脂肪細胞的分離、表徵和分化

【0122】如先前所述進行來自VAT的兔前脂肪細胞（rPAD）的分離（馬內斯基等人2012）。將該等細胞在完全培養基中培養。使用P1培養物。用各種單克隆抗體（例如，CD34-PE、CD45-FITC、CD31-FITC、CD14-PE、CD90-PE、CD106-FITC以及CD105-PE）藉由流動式細胞術對rPAD進行表徵，如先前所描述（馬內斯基等人2012）。在匯合後2天藉由將rPAD暴露於在補充5%剝離FBS的DMEM中的分化混合物（DIM）（例如，含有5 mg/ml 胰島素、1 mM地塞米松和0.5 mM 3-異丁基-1-甲基黃嘌呤的混合物（IBMX））來誘導rPAD的分化。

葡萄糖攝取

【0123】如先前所描述測量rPAD的葡萄糖攝取（馬內斯基等人2012）。將DIM暴露的rPAD在無血清培養基中培養24小時，接著在增加濃度的胰島素中培養以便評價胰島素依賴性刺激。在培養期結束時，將rPAD與³H-2-去氧-D-葡萄糖一起進一步培養。使用藉由閃爍光譜測定測量所結合的放射性。

實驗動物和飲食

【0124】將動物在22°C下在12：12-小時光照黑暗循環中單獨圈養在標準籠子中。小鼠可以購買（例如，從傑克遜實驗室（The Jackson Laboratory）（巴爾港（Bar Harbour），ME））。雄性GLP-1受體缺陷型（GLP-1RKO）小鼠來源於雜合接合對（斯考奇（Scrocchi）等人，自然醫學（*Nat. Med.*）2，1254（1996））。爲了誘導NASH，由高脂肪、高果糖和高膽固醇組成的兩種飲食進行了測試，其中脂肪的來源將係反式脂肪抑或豬油。無果糖或膽固醇的低脂肪飲食用作對照飲食。

研究和藥物給予

【0125】爲了表徵NASH的發展，將*Lep^{ob}/Lep^{ob}*或B6小鼠維持低脂肪飲食（LFD），高反式脂肪、高果糖、高膽固醇（HTF）飲食，抑或高豬油脂肪、高果糖、高膽固醇飲食（HLF）（例如，持續8或12週）。將小鼠皮下植入遞送媒介物（例如，無菌水中的50% DMSO）抑或本申請案之醫藥組合物的一個單個滲透微型泵。此外或可替代地，可以經由口服胃管灌食法每日一次向小鼠給予媒介物抑或本申請案之醫藥組合物。

【0126】爲了評定體重損失對肝終點的影響，可以重複在如上所述暴露於LFD或HTF飲食的*Lep^{ob}/Lep^{ob}*小鼠中的初始研究。在LFD或HTF飲食8週之後，將所有小鼠植入遞送媒介物抑或本申請案之醫藥組合物的滲透微型泵。此外或可替代地，可以經由其他給藥途徑（如口服胃管灌食法）每日一次向小鼠給予媒介物抑或本申請案之醫藥組合物。將HTF組的一子集植入含有媒介物的微型泵並且進行卡路里限制以便引發與在藥物處理的小鼠中觀察到的類似的重量損失程度。

肝組織的組織學和生物化學分析

【0127】在終止時，將肝組織切除並固定（例如，在10%中性緩衝的福馬林中）。將肝組織石蠟包埋、切片並固定且用蘇木精和曙紅染色。爲了視覺化纖維化，將另一組切片用馬森氏三色染色（Masson trichrome）進行染色。將切片首先用維格特（Weigert's）鐵蘇木精染色，接著比布列希猩紅（Biebrich scarlet）、磷鎢酸/磷鉬酸和苯胺藍處理。將第二組切片使用靶向巨噬細胞標誌物Mac-2之抗體免疫染色。由不知道處理條件的病理學家進行所有組織學分析。

血漿激素和代謝物分析

【0128】測量血漿葡萄糖、甘油三酯、總膽固醇、ALT以及天冬胺酸胺基轉移酶（AST）水平（例如，藉由使用奧林巴斯（Olympus）AU400e生物

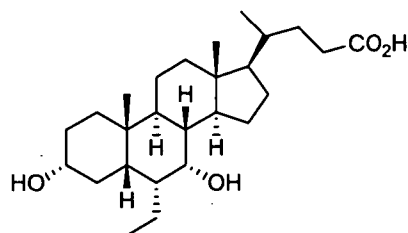
分析儀（奧林巴斯美國診斷公司（Olympus America Diagnostics），中心穀（Center Valley），賓夕法尼亞州（PA））。將血漿樣品用PBS 1:10稀釋以用於檢測標準曲線範圍內的ALT和AST。測量總血漿脂聯素（例如，藉由根據製造商的說明書使用可商購的ELISA（密理博（Millipore），比勒利卡（Billerica），麻塞諸塞州（MA））。

定義

【0129】爲了方便起見，在此集中了在說明書、實例和所附申請專利範圍書中使用的某些術語。

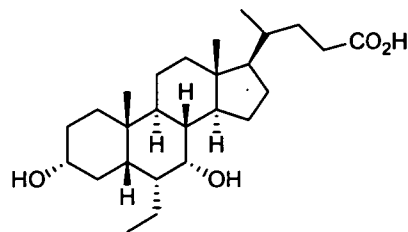
【0130】如在此所用，術語“FXR激動劑”係指活化FXR的任何化合物。在一方面，FXR激動劑相對於CDCA實現FXR的至少50%活化，該等測定方法中的適當陽性對照描述於WO 2000/037077中。在另一方面，FXR激動劑在如WO2000/037077中所述的閃爍親近測定或HTRF測定中實現FXR的100%活化。FXR激動劑的實例包括但不限於在U.S. 7,138,390；7,932,244；20120283234；20120232116；20120053163；20110105475；20100210660；20100184809；20100172870；20100152166；20100069367；20100063018；20100022498；20090270460；20090215748；20090163474；20090093524；20080300235；20080299118；20080182832；20080039435；20070142340；20060069070；20050080064；20040176426；20030130296；20030109467；20030003520；20020132223以及20020120137中描述的那些。

【0131】如在此所用，術語“奧貝膽酸”或“OCA”係指具有以下化學結構之化合物：



【0132】奧貝膽酸還被稱為奧貝膽酸形式1、INT-747、3 α ,7 α -二羥基-6 α -乙基-5 β -膽烷-24-酸、6 α -乙基-鵝去氧膽酸、6-乙基-CDCA、6ECDCA、膽烷-24-酸,6-乙基-3,7-二羥基-,(3 α ,5 β ,6 α ,7 α)，並且可以藉由在美國公開號2009/0062526 A1、美國專利號7,138,390以及WO2006/122977中描述的方法來製備。奧貝膽酸的CAS登記號係459789-99-2。

【0133】如在此所用，術語“結晶奧貝膽酸”係指具有以下化學結構之化合物的任何結晶形式：



【0134】結晶奧貝膽酸意指該化合物在三個空間維度中結晶成特定晶體堆積排列或該化合物具有外表面平面。奧貝膽酸的固體形式可以結晶成不同的晶體堆積排列，所有該等排列都具有相同的奧貝膽酸元素組成。不同晶體形式通常具有不同的X-射線衍射圖案、紅外光譜、熔點、密度硬度、晶體形狀、光學和電學性質、穩定性以及溶解度。重結晶溶劑、結晶速率、儲存溫度以及其他因素可能造成一種晶體形式佔優勢。奧貝膽酸的晶體可以藉由在不同條件（例如，不同的溶劑、溫度等）下結晶來製備。OCA的結晶形式的實例在共同未決的美國公開號20130345188中進行了描述。

【0135】術語“第一化合物”意指具有式I之化合物或化合物1，或其藥學上可接受的鹽或胺基酸銜合物。每當該術語在本申請案的背景下使用時，

應當瞭解提及游離鹼、同位素標記的化合物、結晶化合物或其相應藥學上可接受的鹽或胺基酸軛合物，條件係在這種情況下這係可能的和/或適當的。

【0136】如在此所用，術語“胺基酸軛合物”係指本申請案之第一化合物（例如，具有式I之化合物）與任何適合的胺基酸的軛合物。例如，具有式I之化合物的這種適合的胺基酸軛合物將具有在膽汁或腸液中完整性增強的附加優點。適合的胺基酸包括但不限於甘胺酸、肌胺酸和牛磺酸。因此，本申請案涵蓋本申請案之第一化合物（例如，化合物1）的甘胺酸、肌胺酸和牛磺酸軛合物。

【0137】“治療”包括產生病狀、疾病、病症等的改善的任何作用，例如減輕、減少、調節或消除。疾病狀態的“治療（Treating）”或“治療（treatment）”包括：抑制該疾病狀態，即阻止該疾病狀態或其臨床症狀的發展；或減輕該疾病狀態，即引起該疾病狀態或其臨床症狀的暫時或永久消退。

【0138】“預防”該疾病狀態包括使該疾病狀態的臨床症狀不在可能暴露於或易患該疾病狀態、但尚未經歷或顯示該疾病狀態的症狀的受試者中發展。

【0139】如在此所用的術語“抑制（inhibiting）”或“抑制（inhibition）”係指對疾病或病狀的發展或進展的任何可檢測的積極效果。這樣一種積極作用可以包括該疾病或病狀的至少一種症狀或病徵的發作的延遲或預防，該一種或多種症狀或一種或多種病徵的減輕或逆轉，以及該一種或多種症狀或一種或多種病徵的進一步惡化的減緩或預防。

【0140】“疾病狀態”意指任何疾病、病症、病狀、症狀或適應症。

【0141】如在此所用的術語“有效量”或“治療有效量”係指第一化合物（例如，FXR活化配位基）或至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）的在適當劑量給藥（單獨或組合）後產生急性或慢性治療作用之量。在一個實例中，一第一化合物（例如，FXR活化配位基）的有效量或治療有效量在與至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）組合適當劑量給藥後產生急性或慢性治療作用。該作用包括疾病/病狀（例如，肝、腎或腸的纖維化）以及達到任何可檢測程度的相關併發症的症狀、病徵和潛在病理的預防、矯正、抑制或逆轉。“有效量”或“治療有效量”將取決於第一化合物、另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）、該疾病及其嚴重程度以及待治療受試者的年齡、體重等而變化。

【0142】一第一化合物的治療有效量可以與一種或多種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）以及視情況一種或多種藥學上可接受的載體一起配製以用於給予至人或一種非人動物。因此，本申請案之醫藥組合物可以例如經由口服、胃腸外或局部途徑給予，以便提供有效量的第一化合物和另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）。在替代實例中，本申請案之組合物可以用於塗覆或浸漬醫療裝置，例如支架。

【0143】如在此所用的“藥理學作用”涵蓋在受試者中產生的實現一種療法的預期目的的作用。在一個實例中，藥理學作用意指所治療的受試者的主要適應症得以預防、減輕或減少。例如，藥理學作用將係產生所治療受試者的主要適應症的預防、減輕或減少的藥理學作用。在另一個實例中，藥理學作用意指所治療受試者的主要適應症的病症或症狀得以預防、減輕或減少。例如，藥理學作用將係產生所治療受試者的該等病症或症狀的預防、減輕或減少的藥理學作用。

【0144】應當瞭解，除非另外指示，從不對稱碳原子產生的異構物（例如，所有對映異構物和非對映異構物）都包括在本申請案的範圍內。這類異構物可以藉由經典分離技術和藉由立體化學控制的合成以基本上純的形式獲得。

【0145】“醫藥組合物”係呈適合給予至受試者的形式的含有治療劑，如第一化合物和至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）的配製物。在一個實例中，該醫藥組合物係呈散裝形式或呈單位劑型。以易於給予和實現劑量均勻性的劑量單位形式配製組合物可以是有利的。如在此使用的劑量單位形式係指適合作為用於待治療的受試者的單一劑量的物理上離散單位；每個單位含有預定量的經計算結合所需藥用載體可產生所希望治療作用的活性試劑。本申請案之劑量單位形式的規格由以下因素支配且直接取決於以下因素：活性劑的獨特特徵和待實現的特定治療作用，以及調配這種活性劑以用於治療個體的領域中固有的限制。

【0146】術語“單位劑型”係指適於作為用於人和其他哺乳動物的單位劑量的物理離散單位，每個單位含有預定量的經計算結合如在此所述的適合的藥用賦形劑可產生所希望的治療作用的活性材料。

【0147】該單位劑型係多種形式中的任一種，包括例如膠囊、IV袋、片劑、氣霧劑吸入器上的單個泵或小瓶。第一化合物或其藥學上可接受的鹽或胺基酸衍生物在組合物的單位劑量中的量係一有效量，並且根據所涉及的特定治療和/或用於該治療的一種或多種另外的治療劑而變化。熟習該項技術者將瞭解，取決於患者的年齡和狀況對劑量進行常規變化有時是必要的。劑量還將取決於給藥途徑。考慮多種途徑，包括口服、肺部、直腸、胃腸外、經皮、皮下、靜脈內、肌內、腹膜內、吸入、經頰、舌下、胸膜內、鞘內、鼻內等。用於局部或經皮給予本申請案之化合物的劑型包括粉劑、

噴霧劑、軟膏、糊劑、乳膏、洗劑、凝膠、溶液、貼劑以及吸入劑。在一個實例中，該第一化合物和/或該至少一種另外的治療劑在無菌條件下與藥學上可接受的載體以及與所需要的任何防腐劑、緩衝劑或推進劑一起混合。

【0148】如在此所用，“PO”或“經口(per os)”係指口服給藥；“SQ”係指皮下給藥；並且“QD”係指每日一次給藥。

【0149】術語“閃釋劑量”係指為快速分散劑型的配製物。

【0150】術語“立即釋放”被定義為治療劑（如一第一化合物或至少一種另外的治療劑）在相對較短的時間段（通常至多約60分鐘）中從劑型的釋放。術語“改良釋放”被定義為包括延緩釋放、延長釋放和脈衝釋放。術語“脈衝釋放”被定義為從劑型的一系列藥物釋放。術語“持續釋放”或“延長釋放”被定義為治療劑在延長的時間段內從劑型的連續釋放。

【0151】“受試者”包括哺乳動物，例如，人、伴侶動物（例如，狗、貓、鳥等）、農場動物（例如，牛、綿羊、豬、馬、家禽等）以及實驗室動物（例如，大鼠、小鼠、豚鼠、鳥等）。在一個實例中，受試者係人。在一方面，受試者係雌性。在一方面，受試者係雄性。

【0152】如在此所用，短語“藥學上可接受”係指在合理醫學判斷的範圍內適用於與人類和動物的組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，與合理益處/風險比相稱的那些化合物、材料、組合物、載體和/或劑型。

【0153】“藥學上可接受的載體或賦形劑”意指總體上安全、無毒，並且在生物學上以及其他方面並非不合需要的適用於製備一醫藥組合物的載體或賦形劑，並且包括可為獸醫使用以及人藥物使用接受的賦形劑。如在本說明書和申請專利範圍中使用的“藥學上可接受的賦形劑”包括一種和多於一種這種賦形劑。

【0154】雖然有可能在無任何配製物的情況下直接給予第一化合物，但第一化合物可以呈包含一藥學上可接受的賦形劑的藥用配製物的形式給予。這種配製物可以藉由多種途徑給予，該等途徑包括口服、經頰、直腸、鼻內、經皮、皮下、靜脈內、肌內以及鼻內。

【0155】在一個實例中，該第一化合物和/或該至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的另外的治療劑）可以經皮給予。爲了經皮給予，需要經皮遞送裝置（“貼片”）。這類經皮貼片可以用於以受控的量提供本申請案之化合物的連續或不連續輸注。用於藥劑遞送的經皮貼片的構造和使用係本領域中熟知的。參見，例如美國專利號5,023,252。這類貼片可以被構造用於藥劑的連續、脈衝式或按需遞送。

【0156】在一個實例中，本申請案之醫藥組合物適於經頰和/或舌下或經鼻給予。此實例以避免胃併發症之方式（如藉由胃系統和/或藉由肝的首過代謝）提供第一化合物的給予。這種給藥途徑還可以減少吸附時間，從而提供治療益處的更快起效。

【0157】該第一化合物可以在一較寬劑量範圍內給予。例如，每天劑量通常在約0.0001至約30 mg/kg體重的範圍內。在成人的治療中，使用在單次或分次劑量中約0.1至約15 mg/kg/天的範圍。在一個實例中，該配製物包含約0.1 mg至約1500 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約1 mg至約100 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約1 mg至約50 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約1 mg至約30 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約4 mg至約26 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約5 mg至約25 mg之第一化合物。在另一個實例中，該配製物包含約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約25 mg、約30 mg、約35 mg、約40 mg、約45 mg或約50 mg之第一化合物。然而，應

第 49 頁，共 84 頁(發明說明書)

當瞭解，實際給予的第一化合物的量將由醫師根據相關情況（包括有待治療的病狀，所選擇的給藥途徑，所給予的第一化合物的形式，所給予的一種或多種另外的治療劑，個體患者的年齡、體重和反應，以及患者症狀的嚴重程度等）來確定。因此，上述劑量範圍不旨在以任何方式限制本申請案的範圍。在一些情況下，低於上述範圍下限的劑量水平可能係足夠的，而在其他情況下可能使用不引起任何有害副作用的仍然更大的劑量，條件係將這類更大的劑量首先分成數個小劑量以用於全天給予。

【0158】 “纖維化”係指在一組織或器官中涉及過度纖維結締組織（例如，瘢痕組織）的發展的病狀。瘢痕組織的這種產生可以響應於由於疾病、外傷、化學毒性等所致的器官的感染、炎症或損傷而發生。纖維化可以在各種不同的組織和器官（包括肝、腎、腸、肺、心臟等）中發展。

【0159】 如在此所用，“膽汁淤積病狀”係指來自肝的膽汁排泄受損或被阻斷的任何疾病或病狀，該疾病或病狀可以在肝抑或在膽管中發生。肝內膽汁淤積和肝外淤積係兩種類型的膽汁淤積病狀。肝內膽汁淤積（其在肝內部發生）最常見於原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎、敗血症（全身感染）、急性酒精性肝炎、藥物中毒、全胃腸外營養（靜脈內供給）、惡性腫瘤、囊性纖維化以及妊娠中。肝外膽汁淤積（其在肝外部發生）可以由膽管腫瘤、狹窄、囊腫、憩室、膽總管中的結石形成、胰腺炎、胰腺腫瘤或假性囊腫以及由於一附近器官中的團塊或腫瘤所致的壓縮引起。

【0160】 膽汁淤積病狀的臨床症狀和病徵包括：發癢（瘙癢）、乏力、黃疸皮膚或眼睛、無法消化某些食物、噁心、嘔吐、白便、尿色深以及右上腹腹痛。患有膽汁淤積病狀的患者可以基於一組標準臨床實驗室測試進行診斷和臨床跟蹤，該等測試包括患者血清中的鹼性磷酸酶、 γ -穀胺醯轉肽酶（GGT）、5'核苷酸酶、膽紅素、膽汁酸以及膽固醇水平的測量。通常，

第 50 頁，共 84 頁(發明說明書)

如果所有三種診斷標誌物鹼性磷酸酶、GGT和5'核苷酸酶的血清水平都被認為異常升高，則患者被診斷為患有一種膽汁淤積病狀。該等標誌物的正常血清水平可能取決於測試方案，因實驗室和程序而異在一定程度上變化。因此，醫師將能夠基於具體的實驗室和測試程序確定對於該等標誌物中的每種，異常升高的血液水平係什麼。例如，患有膽汁淤積病狀的患者通常在血液中具有大於約125 IU/L 鹼性磷酸酶、大於約65 IU/L GGT以及大於約17 NIL 5'核苷酸酶。由於血清標誌物的水平的變化性，除了上述症狀中的至少一種（如發癢（瘙癢））之外，膽汁淤積病狀可以基於這三種標誌物的異常水平進行診斷。

【0161】術語“原發性膽汁性肝硬化”可與術語“原發性膽汁性膽管炎”互換使用，並且經常被縮寫為PBC。PBC係以肝的小膽管的緩慢進行性破壞為特點的肝的自身免疫性疾病，其中小葉內導管（赫令管（Canals of Hering））在疾病早期受影響。當該等導管被損傷時，膽汁在肝中積聚（膽汁淤積）並且隨時間推移損傷該組織。這可能會導致疤痕形成、纖維化和肝硬化。原發性膽汁性肝硬化的特徵在於小葉間膽管破壞。原發性膽汁性肝硬化的組織病理學發現包括：膽管炎症，其特徵在於上皮內淋巴細胞和管週上皮樣肉芽腫。存在PBC的4個階段。

【0162】階段1 — 門靜脈階段：正常大小的三聯體；門靜脈炎症；細微膽管損傷。通常在此階段中檢測到肉芽腫。

【0163】階段2 — 門靜脈週階段：擴大的三聯體；門靜脈週纖維化和/或炎症。典型地，這個階段的特徵在於發現小膽管的增生。

【0164】階段3 — 中隔階段：主動和/或被動纖維間隔。

【0165】階段4 — 膽汁性肝硬化：結節存在；加蘭（garland）

【0166】術語“原發性硬化性膽管炎”(PSC)係膽管的引起在肝內(肝內部)和肝外(肝外部)水平下的膽管炎症和隨後阻塞之疾病。炎症阻礙膽汁到腸道的流動，這最終可能導致肝的肝硬化、肝衰竭和肝癌。

【0167】術語“非酒精性脂肪性肝炎”(NASH)係由脂肪在肝中的積聚引起的肝炎症。在一些人中，脂肪的積聚引起肝的炎症。由於炎症，肝不能如其應當起作用一樣良好地起作用。NASH可能變得更嚴重並且引起肝的癥痕形成，這導致肝硬化。NASH類似於由長期大量飲酒造成的那種肝病。但NASH在不酗酒的人中發生。

【0168】術語“器官”係指由細胞和組織組成且執行生物體的一些特定功能的分化的結構(如在心臟、肺、腎、肝等中)。該術語還涵蓋執行一功能或在活動中協作的身體部分(例如，構成視覺器官的眼睛和相關結構)。術語“器官”進一步涵蓋分化的細胞和組織的能夠潛在發育成一種完整結構的任何部分結構(例如，肝的葉或區段)。

【0169】在此引用的全部出版物和專利文獻藉由引用結合在此，如同每一份這樣的出版物或者文獻都被具體地和分別地指出已藉由引用結合在此。出版物和專利文件的引用不欲承認任一個為相關先前技術，並且其也不構成關於其內容或日期的任何承認。本申請案現已以書面描述的方式進行了描述，熟習該項技術者將認識到，本申請案的該等組合物和方法可以在多個實例中實踐，並且在此提供的描述和實例出於說明的目的並且不對以下申請專利範圍書構成限制。

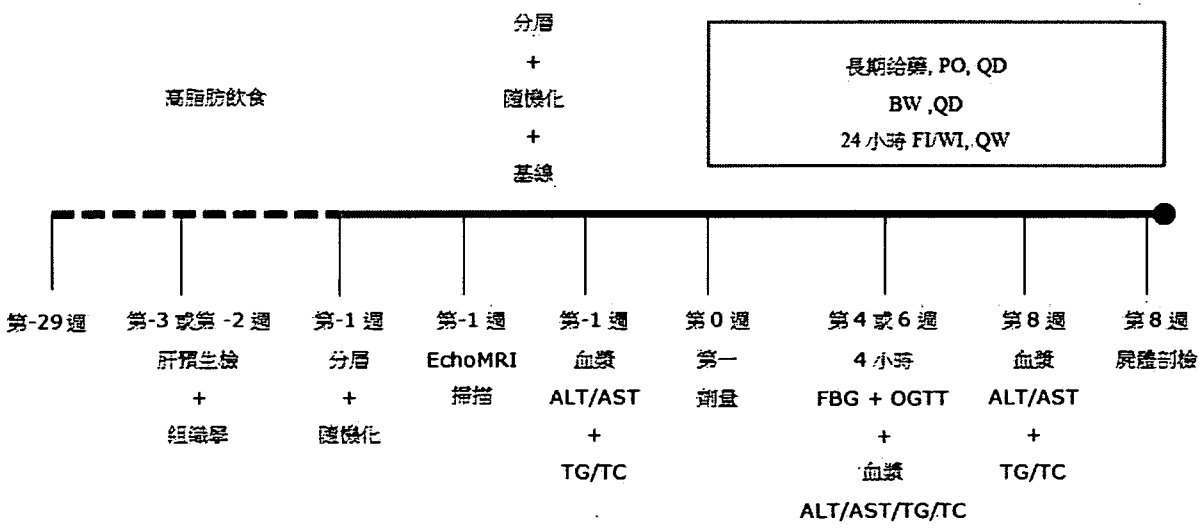
【0170】在本說明書中，除非上下文另外明確規定，否則單數形式也包括複數。除非另外定義，否則在此使用的所有技術和科學術語具有與熟習該項技術者通常所理解的相同的含義。在衝突的情況下，以本說明書為準。除非另外指出，否則在此使用的所有百分比和比率都是按重量計。

實例

實例1：C57BL/6j小鼠中飲食誘導的肥胖性NASH

【0171】進行該等研究以便評價奧貝膽酸（OCA）和降低血糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性的治療劑（單獨的或組合的）對飲食誘導的肥胖小鼠NASH小鼠中的代謝參數、肝病理和NAS活動度評分的作用。在實例2、實例3和實例4中使用的治療劑分別是利拉魯肽（LIRA）、二甲雙胍（MET）或西他列汀（SIT）。在一個研究中，抗血糖劑係恩格列淨（EMP）。此外，進行肝基因表現譜分析和隨後的途徑分析以便確定該組合係否調控未由任一單一療法治療調控的新穎基因和/或更強烈地調控也受單一療法影響的基因。

研究概述



動物、圈養和飲食

【0172】在5週齡時，雄性C57BL/6小鼠購自法國維耶（JanVier, France），並且轉移至測試畜舍。在馴化和高脂肪飲食誘導期過程中，將小鼠在12:12小時光照-黑暗循環下（在從3AM-3PM光照）在受控的溫度條件（22 ± 1°C；50% ± 10%相對濕度）下每籠五隻分組圈養在定做櫥櫃中。在整個飲食誘導

和研究期間，小鼠隨意獲取高脂肪飲食 (n=110, DIO-NASH) (D09100301, 研究飲食, USA) (40%脂肪 (18%反式脂肪)、40%碳水化合物 (20%果糖) 和2%膽固醇) 或常規齧齒動物食物 (n=10, LEAN-CHOW) (Altromin1324, Brogaarden, 丹麥) 和自來水。在實驗之前將動物保持飲食持續28週，並且在整個研究期間維持飲食。在術後恢復過程中和在整個研究期間，將所有動物單獨圈養。

分配到研究中、分層隨機化和基線監測

【0173】在27週飲食誘導之後，藉由組織學評定針對肝脂肪變性進展獲得肝生檢。在給藥之前在第-2週 (SIT組合) 或第-1週 (LIRA和MET組合) 時，根據脂肪變性評分和體重進行分層隨機化為治療組。使用 EchoMRI (EchoMRI, USA) 對動物進行掃描以便確定身體組成分析。該EchoMRI 掃描測量脂肪和無脂肪組織質量。在非空腹和意識狀態中從臉頰 (下頷下) 收集血液樣品以用於ALT、AST、TG和TC水平的基線血漿分析。

預先生檢程序

【0174】在操作程序當天，將小鼠用100%氧氣中的異氟烷 (2%-3%) 麻醉。在中線中作出一小腹部切口並且暴露肝左外葉。將肝組織的錐形楔 (約100 mg) 從該葉的遠端部分切除，稱重，並固定在4%多聚甲醛 (PFA) 中以用於組織學。使用雙極電凝 (ERBE VIO 100手術電刀) 將肝的切割表面立即電凝。將肝返回腹腔並且將腹壁縫合且用縫合器閉合皮膚。對於手術後恢復，將小鼠給與卡洛芬 (5 mg/ml - 0.01 ml/10g) 並且在手術程序當天和手術後第1天和第2天皮下給予恩諾沙星 (enrofloxazin) (5mg/ml - 1 ml/kg)。

【0175】用於組織學評定的肝生檢切片製備：在4% PFA中過夜儲存之後，將肝生檢切片過夜浸潤在自動Miles Scientific Tissue-TEK VIP-TEK組織處

第 54 頁，共 84 頁(發明說明書)

理器中的石蠟中並且隨後包埋在石蠟塊中。將來自五隻不同動物的生檢切片包埋在塊上。然後，對該等塊進行修整並且在Microm HM340E超薄切片機（賽默科技公司（Thermo Scientific））上切割兩個3 μm 切片（用於H&E染色）。兩個塊被放置在一載玻片上，從而得到每個載玻片代表10隻不同動物的總計10個生檢切片。將切片靜置乾燥過夜。如由克萊納（Kleiner）等人（2005）所概述由不知道處理條件的組織學家進行分層且隨機化為治療組的脂肪變性程度的評價。

血液和血漿分析

【0176】將血液樣品收集到10 μL 肝素化玻璃毛細管中。將該樣品立即懸浮於緩衝液（0.5 ml的葡萄糖/乳酸鹽系統溶液（EKF診斷公司（EKF-diagnostics），德國）並且在測試當天使用BIOSEN c線血糖儀（EKF診斷公司，德國）針對葡萄糖進行分析。對於甘油三酯和膽固醇含量，將100 μL 血液收集到鋰-肝素管中。將血漿分離並且在分析之前將樣品儲存在4 $^{\circ}\text{C}$ 下持續一天。

口服葡萄糖耐量測試（OGTT）

【0177】在治療的第4週（LIRA和MET組合）或第6週（SIT組合），在有意識的自由活動動物中進行OGTT。最近藥物劑量在OGTT之前約18小時給予並且動物在測試之前未接受藥物給藥。將動物在測試開始之前禁食4小時（從6 AM至10 AM食物除去）。在 $t=0$ 時，小鼠藉由口服胃管灌食法（10 ml/kg）接受葡萄糖的口服丸劑（2 g/kg）（200 mg/ml；費森尤斯卡比公司（Fresenius Kabi），瑞典）。從尾靜脈（藉由剪斷）收集血液樣品並且在口服葡萄糖給予之後的0、15、30、60和120分鐘時間點測量血糖。在血液取樣之後使小鼠再進食並且照常藥物給藥。

終止和屍體剖檢

【0178】將動物在第8週（治療第56天）在非禁食狀態下終止。最近藥物劑量在終止之前約18小時給予並且動物在終止之前未接受藥物給藥。將動物藉由CO₂/O₂誘導並且在麻醉（異氟烷）過程中，打開腹腔並且獲得心血以用於收集終末血漿。在屍體剖檢之後，收集全肝並稱重。將左外葉分成數片，並且快速冷凍在液氮中以用於基因表現分析和4% PFA中以用於組織學和生物化學分析。一片肝被快速冷凍在液氮中以用於生物化學分析。

肝組織處理

【0179】終末肝組織：在處理8週之後，收集全肝，稱重並從左外葉切除肝生檢切片且立即置於4% PFA（約150-200 mg）中並快速冷凍（約50 mg）。將肝片（約100 mg）收集在FastPrep管鐘並在液氮中快速冷凍。

【0180】用於組織學的固定、包埋和切片：在4% PFA中過夜固定之後，將肝生檢切片過夜浸潤在一自動Miles Scientific Tissue-TEK VIP-TEK組織處理器中的石蠟中並且隨後包埋在石蠟塊中。將來自五隻不同動物的生檢切片包埋在塊中。對該等塊進行修整並且在Microm HM340E超薄切片機（賽默科技公司）上切割兩個3 μm切片/塊。

【0181】用於肝甘油三酯和膽固醇分析的組織均質化：將1 mL 5% NH₄OH/ddH₂O溶液(ab142227, 艾博抗公司(Abcam))添加至快速FastPrep管。將該等管放置在FastPrep均質器中並振盪2x60秒。在均質化後，將該等樣品在加熱塊中緩慢加熱至80°C-100°C持續3分鐘。在冷卻至室溫之後，重複該加熱步驟。使用微量離心機將該等樣品在最高速度下離心兩分鐘以便除去任何不溶性物質。將上清液儲存在-80°C下直到使用。根據製造商的說明書使用自動分析儀Cobas C-111與商業套組（羅氏診斷公司（Roche Diagnostics），德國）在單一測定中測量肝勻漿中的甘油三酯和膽固醇含量。

【0182】用於RNAseq的RNA純化：使用MP FastPrep系統進行組織的溶解。簡言之，如由供應商所建議，將30-50 mg肝生檢切片均質化並且用於在NucleoSpin Plus RNA柱（馬歇雷-納蓋爾（Macherey-Nagel））上提取RNA。使用NanoDrop 2000分光光度計（賽默科技公司）評定RNA的量。

肝脂肪變性評定

【0183】爲了評定肝脂肪變性，將肝切片用H&E染色，隨後用Visiormorph軟體（Visiopharm，哥本哈根（Copenhagen），丹麥）進行分析。使用被設計用於特定目的方案，脂肪變性的終末肝定量評定被描述爲總面積的百分比。HE染色：將石蠟包埋的切片在二甲苯中脫石蠟並且在一系列分級乙醇中再水化。然後將切片在梅氏蘇木精（目錄號S3309，達科公司（Dako））中培養5分鐘，在流動的自來水中洗滌5分鐘，且然後在曙紅Y溶液（目錄號HT110280 2.5L，西格瑪-奧德里奇公司）中染色持續15秒。將載玻片水合，用Pertex安裝並允許在掃描之前乾燥。

總NAFLD（NAS）活動度評分

【0184】NAFLD活動度評分（NAS）爲患者提供誰最可能患有NASH的數值，並且係脂肪變性（0-3）、小葉炎症（0-3）和肝細胞氣球樣（0-3）的單獨得分的總和。大多數NASH患者呈現≥ 5的NAS得分。在該等實驗中，收集來自左外葉的終末肝組織以用於藉由使用由克萊納和同事（用於非酒精性脂肪肝病的組織學評分系統的設計和驗證（Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease），克萊納等人，肝臟病學（Hepatology）41；2005）概述的臨床標準進行NAS。用於測定NAS的標準提供於以下表1中。

表1.

特徵	程度	得分
----	----	----

第 57 頁，共 84 頁(發明說明書)

脂肪變	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
小葉炎症	無病灶	0
	<2 個病灶/200x	1
	2-4 個病灶/200x	2
	>4 個病灶/200x	3
氣球樣變性	無	0
	一些	1
	許多細胞/顯著氣球樣	2

RNA-seq：肝終末基因表現和生物資訊學分析

【0185】使用與參考（STAR）軟體的剪接轉錄物比對，將測序資料與從Ensembl資料庫獲得的小家鼠基因組進行比對。在HTSeq包中可用的python腳本HTSeq-計數用於計算映射至注釋區域的讀數的數目。所有下游分析步驟被實施為腳本R。對於生物資訊學分析，使用標準RNA-seq質量控制參數評價資料的質量。為了評價組間和組內變化性，進行主成分分析和分層聚類。為了鑒別差異表現的基因，使用了R-包邊緣R。差異表現基因的列表與關於所建立的NASH生物標誌物的資訊交叉引用。進行途徑分析以便鑒別在多組之間差異擾動的途徑。

實例2. C57BL/6j小鼠中飲食誘導的肥胖性NASH：奧貝膽酸（OCA）±利拉魯肽（LIRA）

用於該研究的方案和分析提供於實例1中。

處理組

組1：媒介物（PO）+媒介物（SQ）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週給予媒介物。

組2：OCA（PO）+媒介物（SQ）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA。

組3：LIRA（SQ）+媒介物（PO）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以0.1 mg/kg的劑量給予LIRA。

組4：OCA（PO）+媒介物（SQ）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA。

組5：LIRA（SQ）+媒介物（PO）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以0.4 mg/kg的劑量給予LIRA。

組6：OCA（PO）+LIRA（SQ）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA且以0.1 mg/kg的劑量給予LIRA。

組7：OCA（PO）+LIRA（PO）

將小鼠（n=12）從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA且以0.4 mg/kg的劑量給予LIRA。

組8：瘦食物對照組

將小鼠（n=9）從第0週至第8週飼餵瘦食物。

化合物和給藥

【0186】所有小鼠每日一次接受PO（OCA）或SQ（LIRA）給藥。第0天係給藥的第一天，而第55天係最後一天。因此，將小鼠從第0天直至且包括第55天每日一次給藥。該等小鼠接受治療劑抑或單獨媒介物的總計112個劑量。將動物在2:00-4:00 PM之間進行處理。將OCA溶解於1 mg/ml和3 mg/ml

第 59 頁，共 84 頁(發明說明書)

的最終儲備液濃度中，最終劑量濃度分別是10 mg/kg和30 mg/kg。用於OCA的媒介物係0.5%羧甲基纖維素鈉（CMC）。

結果和討論

NAS得分

【0187】非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的診斷係藉由肝生檢切片上脂肪變性、炎症和肝細胞氣球樣的特徵性模式的存在建立的。NAFLD活動度評分（NAS）為患者提供誰最可能患有NASH的數值，其中大多數患者具有NAS值 ≥ 5 的NASH。評價OCA（10和30 mg/kg，PO）和LIRA（0.1和0.4 mg/kg，SQ）（單獨的和組合的）對DIO-NASH小鼠中的總NAS值和單獨組分NAS值的作用。如實例1A中所使用，低劑量組合係指OCA（10 mg/kg）/LIRA（0.1 mg/kg），而高劑量係指OCA（30 mg/kg）/LIRA（0.4 mg/kg）。

【0188】第1A圖和第1B圖分別描繪在八週處理之後，OCA和LIRA的低劑量組合和高劑量組合的NAS得分的降低。該資料指示，低劑量組合和高劑量組合兩者均相對於對照降低總NAS。具體地說，OCA和LIRA的低劑量組合的作用係針對該等媒介物組以及低劑量的單獨OCA統計上顯著的。NAS的最大改善係約三個點。由高劑量組合帶來的改善使NAS值從4.6降低至1.6（ $p < 0.05$ 對比OCA單一療法）。該等點中的大約兩個係由於減少脂肪變性組分。低劑量和高劑量的OCA與LIRA的組合對脂肪變性組分的作用分別在第2A圖和第2B圖中展示。兩個劑量組合均以統計上顯著的方式改善脂肪變性（ $p < 0.05$ 對比OCA或LIRA單一療法）。

肝甘油三酯和膽固醇

【0189】因為脂肪肝的特徵在於脂質（包括甘油三酯和膽固醇）的積聚，所以檢查OCA和LIRA的低劑量組合和高劑量組合的作用。在處理八週之後，該組合以統計上顯著的方式減少肝甘油三酯，如在第3A圖和第3B圖中

第 60 頁，共 84 頁(發明說明書)

所示。兩個劑量組合均降低肝甘油三酯和膽固醇的水平，同時該低劑量組合給與協同作用。關於膽固醇，該高劑量組合以統計上顯著的方式降低肝中的膽固醇的水平，如在第4A圖和第4B圖中所示。

體重和身體組成

【0190】LIRA在U.S.中被指示作為對用於肥胖個體的長期體重管理的生活方式的輔助手段。然而，由於與LIRA相關的潛在風險包括甲狀腺髓樣癌和急性胰腺炎（包括壞死性胰腺炎）的風險，所以FDA要求REMS（風險評估和減輕策略）。因此，使用較低劑量的LIRA，同時維持其最大重量損失作用係極其希望的。在第5圖中提供該低劑量組合對體重的作用。如第5圖中所示，相對於單獨單一療法，OCA和LIRA的低劑量組合協同地使體重降低約13%。關於身體組成，第6A圖和第6B圖揭示，該低劑量組合和高劑量組合相對於體重減少肥胖（或脂肪組織質量）。具體地說，OCA和LIRA的高劑量組合協同地減少小鼠中的肥胖。

轉錄組學分析

【0191】對來自研究小鼠的肝mRNA樣品進行RNA測序，以便深入瞭解關於藉由該等組合療法改善總NAS的潛在機制和途徑。對以下基因進行了檢查：誘導細胞死亡的DFFA樣效應子C；含死亡效應子結構域的DNA結合蛋白2；2-羥基醯基-CoA裂解酶1，凝集素半乳糖結合；氧甾酮（oxysterol）結合蛋白樣3；雌激素受體；胰島素誘導的基因，脂質（lipin）1；以及泛醇-細胞色素C還原酶鉸鏈蛋白質。對在低劑量組合和高劑量組合、對照與每種相應單一療法之間差異調控的基因進行了比較。來自該研究的使小鼠維持高脂肪飲食的作用說明了該等過程，其中顯著上調的和下調的基因隨單一或組合療法治療變化。在第7A圖至第7E圖中提供相對於單一療法，受低劑量組合影響的表現水平的定量值。表2描述參與纖維化發展的基因的預

組2：OCA (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=11) 從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA。

組3：MET (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以50 mg/kg的劑量給予MET。

組4：OCA (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=11) 從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA。

組5：MET (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以150 mg/kg的劑量給予MET。

組6：OCA (PO) +MET (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA且以50 mg/kg的劑量給予MET。

組7：OCA (PO) +MET (PO)

將小鼠 (n=10) 從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA且以150 mg/kg的劑量給予MET。

組8：瘦食物對照組

將小鼠 (n=10) 從第0週至第8週飼餵瘦食物。

化合物和給藥

【0192】所有小鼠每日一次接受PO給藥。第0天係給藥的第一天，而第55天係最後一天。因此，將小鼠從第0天直至且包括第55天每日一次給藥。小鼠接受總計56個劑量。使動物在2:00-4:00 PM之間經受處理。將OCA溶解於1 mg/ml和3 mg/ml的最終儲備液濃度中，最終劑量濃度分別是10 mg/kg和30 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。在5 mg/ml和15 mg/ml的最終儲備液濃度中製備MET，最終劑量濃度分別係50 mg/kg和150 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。用於OCA和MET的媒介物係0.5%羧甲基纖維素鈉 (CMC)。

第 64 頁，共 84 頁(發明說明書)

結果

NAS得分

【0193】非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的診斷係藉由肝生檢切片上脂肪變性、炎症和肝細胞氣球樣的特徵性模式的存在建立的。NAFLD活動度評分（NAS）為患者提供誰最可能患有NASH的數值，其中大多數患者具有NAS得分 ≥ 5 的NASH。檢查了OCA（10和30 mg/kg，PO）和MET（50和150 mg/kg，PO）（單獨的和組合的）對DIO-NASH小鼠中的總NAS和單獨組分NAS的作用。如在實例1B中，低劑量組合係指OCA（10 mg/kg）/MET（50 mg/kg），而高劑量組合係指OCA（30 mg/kg）/MET（150 mg/kg）。

【0194】第9A圖描繪OCA和MET的高劑量組合對總NAS的作用。OCA和MET的高劑量組合在研究結束時以統計上顯著的方式降低NAS（ $p<0.05$ 對比OCA對照）。關於單獨組分，OCA和MET的高劑量組合對脂肪變性組分的作用在第9B圖中展示。

血糖水平

【0195】口服葡萄糖耐量測試（OGTT）係醫學測試，其中口服給予葡萄糖並且隨後取得血液樣品以便測定葡萄糖從血液中清除的時間。進行測定以測試糖尿病、胰島素抗性和受損的 β 細胞功能。在該研究的第四週，口服給予葡萄糖劑量，並且在四個小時之後分析血液水平。第10A圖和第10B圖示出相較於DIO-NASH媒介物組，OCA和MET的低劑量組合和高劑量組合在治療的第4週降低血糖。表4提供低劑量組合和高劑量組合的血糖水平（AUC），如在OGTT中所測量。

表4.

處理組	組 1	組 2	組 3	組 4	組 5	組 6	組 7	組 8
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

OGTT 血糖 AUC , (mmol/L x 分鐘) 第 4 週	1762 ± 45	1680 ± 71	1698 ± 31	1778 ± 88	1480 ± 53 **	1538 ± 43 **	1416 ± 33 ** ++	1615 ± 61
---	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------------	--------------------	--------------------------	--------------

AUC係指曲線下面積；** P<0.01對比組1；並且++ P<0.01對比組6

差異基因表現分析

【0196】對來自研究小鼠的肝mRNA樣品進行RNA測序，以便深入瞭解關於藉由該等組合療法改善總NAS的潛在機制和途徑。對從用OCA和MET（單獨的和組合的）處理的動物收集的終末肝樣品進行差異基因表現分析。對在低劑量組合與每種相應單一療法之間差異調控的基因進行了比較。第11圖和表5上的資料揭露由OCA和MET（單獨的和組合的）調恐的基因的數目。一般來說，雖然該等單一療法處理未相對於媒介物組改變基因，但與改善NASH的協同作用一致，相對於媒介物組，許多基因在該組合中獨特地調控。第12A圖至第12C圖的文氏圖表提供調控的基因的數目的容易比較。該等結果證明與改善NASH的協同作用一致，相對於該等單一療法組，獨特纖維化相關基因在該組合中得到調控。

表5.

處理 組	組 2	組 3	組 4	組 5	組 6	組 7
調控的基因的數 目	21	181	689	120	1109	1858

【0197】對於低劑量組合，膠原受體家族中的以下基因被獨特地調控：14a1型膠原、6a1型膠原和6a2型膠原。分別參見第13A圖至第13C圖。被調控的

第 66 頁，共 84 頁(發明說明書)

所感興趣的其他基因係核心蛋白聚糖受體、colectin亞家族成員10、轉化生長因子 β 受體III以及轉化生長因子(β 誘導的)。參見第14A圖至第14F圖。

【0198】對於高劑量組合，膠原受體家族中的差異調控的基因係14a1型膠原、6a1型膠原和6a2型膠原。分別參見第15A圖至第15C圖。對所感興趣的其他基因如血小板源性生長因子受體 β 、核心蛋白聚糖、colectin亞家族成員10、轉化生長因子 β 受體III以及轉化生長因子(β 誘導的)(第16A圖至第16E圖)進行了檢查。

【0199】關於纖維化因子基因，膠原受體家族係特別感興趣的。膠原在整個身體的許多地方出現。然而，人體中超過90%的膠原係I型。在動物組織中存在29種遺傳上不同的膠原。I、II、III、V以及XI型膠原自組裝成D-週期性交叉條紋的原纖維。在此D係大約67 nm，並且存在膠原的特徵性軸向週期性。該等形成脊椎動物中最豐富的膠原。

【0200】層連結蛋白1受體參與膜重建(從而實現更低的層連結蛋白水平係治療纖維化所希望的)。膠原凝集素編碼C-凝集素家族，即具有膠原樣序列和糖識別結構域的蛋白質的成員。該家族的其他成員係分泌的蛋白質並且結合微生物上的糖抗原，從而有助於該等抗原的識別和清除。核心蛋白聚糖在膠原原纖維組裝中起作用。該蛋白質與多種細胞表面受體的結合介導該蛋白質在腫瘤抑制中的作用，包括對自噬和炎症的刺激作用以及對血管生成和腫瘤發生的抑制作用。腫瘤壞死因子受體超家族和轉化生長因子參與炎症/纖維化進展。

實例4. C57BL/6j小鼠中飲食誘導的肥胖性NASH：奧貝膽酸(OCA)±西他列汀(SIT)

用於該研究的方案和分析提供於實例1中。

處理組

組1：媒介物 (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=11) 從第0週至第8週給予媒介物 (0.5% CMC)。

組2：OCA (PO) +媒介物 (SQ)

將小鼠 (n=11) 從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA。

組3：SIT (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予SIT。

組4：OCA (PO) +媒介物 (SQ)

將小鼠 (n=11) 從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA。

組5：SIT (PO) +媒介物 (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予SIT。

組6：OCA (PO) +SIT (PO)

將小鼠 (n=12) 從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA且以10 mg/kg的劑量給予SIT。

組7：OCA (PO) +SIT (PO)

將小鼠 (n=10) 從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA且以30 mg/kg的劑量給予SIT。

組8：瘦食物對照組

將小鼠 (n=10) 從第0週至第8週飼餵瘦食物。

化合物和給藥

【0201】所有小鼠每日一次接受PO給藥。第0天係給藥的第一天，而第55天係最後一天。因此，將小鼠從第0天直至且包括第55天每日一次給藥。小鼠接受總計56個劑量。使動物經受在2:00-4:00 PM之間的處理。將OCA溶解於1 mg/ml和3 mg/ml的最終儲備液濃度中，最終劑量濃度分別是10 mg/kg和30 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。在5 mg/ml和15 mg/ml的最終儲備液濃

度中製備SIT，最終劑量濃度分別是10 mg/kg和30 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。用於OCA和SIT的媒介物係0.5%羧甲基纖維素鈉（CMC）。

結果

*DPP-IV*活性

【0202】檢查了OCA（10和30 mg/kg，PO）（單獨和與SIT（10和30 mg/kg，PO）組合）對在處理第2週的DIO-NASH小鼠的血漿DPP-IV活性的作用。低劑量組合係指OCA（10 mg/kg）/SIT（10 mg/kg），而高劑量組合係指OCA（30 mg/kg）/SIT（30 mg/kg）。OCA和SIT的低劑量組合以統計上顯著的方式降低DPP-IV活性（ $p < 0.01$ 對比DIO-NASH媒介物）。此外，OCA和SIT的高劑量組合以統計上顯著的方式降低DPP-IV活性（ $p < 0.01$ 對比DIO-NASH媒介物）。該等藥理學結果證明，該等治療劑產生預期作用，即DPP-IV抑制。

實例5. 奧貝膽酸（OCA）±恩格列淨（EMP）

處理組

組1：媒介物（PO）

將小鼠從第0週至第8週給予媒介物（0.5% CMC）。

組2：OCA（PO）+媒介物（PO）

將小鼠從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA。

組3：EMP（PO）+媒介物（PO）

將小鼠從第0週至第8週以3 mg/kg的劑量給予EMP。

組4：OCA（PO）+媒介物（PO）

將小鼠從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA。

組5：EMP（PO）+媒介物（PO）

將小鼠從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予EMP。

第 69 頁，共 84 頁(發明說明書)

組6：OCA (PO) +EMP (PO)

將小鼠從第0週至第8週以10 mg/kg的劑量給予OCA且以3 mg/kg的劑量給予EMP。

組7：OCA (PO) +EMP (PO)

將小鼠從第0週至第8週以30 mg/kg的劑量給予OCA且以10 mg/kg的劑量給予EMP。

組8：瘦食物對照組

將小鼠 (n=10) 從第0週至第8週飼餵瘦食物。

化合物和給藥

【0203】所有小鼠每日一次接受PO給藥。第0天係給藥的第一天，而第55天係最後一天。因此，將小鼠從第0天直至且包括第55天每日一次給藥。小鼠將接受總計56個劑量。使動物在2:00-4:00 PM之間經受處理。將OCA溶解於1 mg/ml和3 mg/ml的最終儲備液濃度中，最終劑量濃度分別是10 mg/kg和30 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。在5 mg/ml和15 mg/ml的最終儲備液濃度中製備EMP，最終劑量濃度分別是3 mg/kg和10 mg/kg。給藥體積係10 mL/kg。用於OCA和EMP的媒介物係0.5%羧甲基纖維素鈉 (CMC)。

【0204】本田 (Honda) 等人，“選擇性SGLT2抑制劑伊格列淨對小鼠中的非酒精性脂肪性肝炎具有治療作用 (The Selective SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin Has a Therapeutic Effect on Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice)”，公共科學圖書館 (PloS)，2016描述鈉葡萄糖共轉運體2抑制劑 (如恩格列淨) 已針對其在DIO-NASH小鼠中的作用進行了研究。

實例6：肝細胞的夾層培養

試劑和溶液

【0205】適合的細胞培養基包括的維莫斯氏 (Waymouth's) MB-752/1、漢姆氏 (Ham's) F12、RPMI 1640、杜氏改良的伊格爾氏 (Eagle's) 培養基、威廉姆斯氏 (Williams') 培養基E、萊博維茨氏 (Leibovitz's) L15以及改良的徐氏 (Chee's) 培養基。IV型膠原酶、I型膠原、珀可 (Percoll)、培養基以及補充劑可以添加至培養基 (例如，血清、抗生素、胺基酸、激素如 DEX、胰島素和生長因子)，灌注緩衝液和其他溶液係可商購的或由可商購的材料製成。其他類型的膠原 (II-IV型)、層連結蛋白、纖連蛋白以及硫酸肝素蛋白聚糖可以用於夾層肝細胞培養中。然而，已經表明，I型和IV型膠原在該等細胞的培養方面優於纖連蛋白和層連結蛋白。

肝細胞的分離

【0206】兩步原位膠原酶灌注方法用於分離肝細胞。簡言之，從雌性路易士大鼠分離肝細胞。將動物麻醉。將肝首先藉由門靜脈用灌注緩衝液原位灌注。將灌注液在進入肝之前進行平衡。隨後用灌注緩衝液中的膠原酶灌注肝。將肝解剖並且轉移至冰冷的灌注緩衝液。將肝包膜挑開，並且將所得細胞懸浮液過濾。藉由離心收集細胞沈澱並且再懸浮。將珀可添加至懸浮液，並且使用珀可密度離心技術分離肝細胞。將混合物離心，並且將細胞沈澱用培養基洗滌兩次。藉由台盼藍排除法測定肝細胞活力。可替代地，使用冷凍保存的肝細胞來代替新鮮分離的肝細胞。

肝細胞的夾層培養

【0207】將分離的肝細胞在塗覆膠原的組織培養板上培養，並且維持在補充有血清、青黴素、鏈黴素、表皮生長因子、胰島素、胰高血糖素以及氫化可體松的培養基中。藉由將I型膠原溶液與培養基進行混合來製備膠原膠凝溶液。將組織培養板塗覆該膠凝溶液並且在37°C下培養以便促進凝膠形成。將肝細胞以適當的密度接種，並維持在37°C下。每24小時更換培養基。

第 71 頁，共 84 頁(發明說明書)

【0208】對於夾層系統，在培養1天之後將一種另外的膠原凝膠溶液分佈在該等細胞上。將培養基小心地去除，以便確保膠原凝膠的第二層均勻地散佈在整個板上。將該等培養板在37°C下培養以便允許在更換培養基之前該第二凝膠層的凝膠化和附著。每天更換培養基。將培養基樣品儲存在-20°C下以用於進一步分析。

【0209】在凝膠膠原的多個層之間培養的肝細胞維持三維立方體形狀和類似於在體內所觀察到的細胞骨架蛋白的分佈。

膽小管網路形成的最優化

【0210】爲了優化牛磺膽酸鹽積聚和膽汁排泄，特定培養基如威廉姆斯氏培養基E和杜氏改良的伊格爾氏培養基可以用於夾層肝細胞培養。

測試物品

【0211】旨在用於研究的FXR激動劑係奧貝膽酸，還稱爲“OCA”和6-乙基鵝去氧膽酸（6-ECDCA）。

實施方式7：評價測試物品對來自肝細胞的葡萄糖釋放的作用

肝細胞分離

【0212】肝係從禁食12小時後的6月齡母豬獲得的。從該等動物收獲組織。基於由Seglen描述的程序藉由兩步原位膠原酶灌注方法的修改分離肝細胞（Seglen，細胞生物學方法（*Methods in Cell Biol.*）13，29（1976））。在動物被殺死的15分鐘內，將肝的右葉除去，並且然後在37°C下用肝灌注介質灌注15-20分鐘，隨後用肝消化介質灌注20-30分鐘。藉由懸浮培養基[26.5 mM NaHCO₃、8.99 mM Na-HEPES、0.2%（wt/vol）BSA部分V、2.22 mM D-果糖，於具有5.5 mM葡萄糖和1 mM丙酮酸鈉的DMEM中]中的消化的肝的溫和破壞分離肝細胞並通過200- μ m篩過濾。將所得細胞懸浮液在500 rpm下離心，丟棄上清液，並且將細胞沈澱再懸浮於預熱（37°C）懸浮培養基

第 72 頁，共 84 頁(發明說明書)

中。細胞活力係使用台盼藍排除法（美國生命技術公司（Life Technologies），格蘭德艾蘭（Grand Island），紐約）評定的，並且一致地高於85%。細胞計數一式三份進行，並且獲得平均值。

懸浮培養物

【0213】在分離後立即將肝細胞用無葡萄糖或丙酮酸得無血清DMEM洗滌三次，且然後以 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 的細胞密度在50-ml錐形管中再懸浮於600 μl 的相同培養基中。將該管在37°C下在連續振盪下單獨或與增加濃度的本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）一起培養10、20和40分鐘。在每個實驗中，在用100 nM胰高血糖素刺激後的葡萄糖輸出用作陽性對照。

【0214】在培養期之後，使用特林德測定套組（西格瑪公司）用葡萄糖-氧化酶方法測定釋放到培養基中的葡萄糖，並且將所有重複樣品的結果針對蛋白質含量標準化，這係使用伯樂（Bio-Rad）蛋白質測定套組測定的。

實施方式8：評價測試物品對肝細胞中的葡萄糖代謝的作用

細胞培養

【0215】藉由肝的膠原酶灌注從雄性斯普拉-道來（Sprague-Dawley）大鼠（200-250g）分離肝細胞，如先前所述（布朗（Brown）等人，生物化學雜誌（*Biochem. J.*）262，425（1989））。如藉由台盼藍排除所評定的活力常規地超過90%。將六孔塗覆膠原的板每孔負載 10^6 個活細胞與2 mL的含10%（vol/vol）胎牛血清的杜氏改良的伊格爾氏培養基。在1小時後，在僅活細胞變得附著到板上的時間期間，將培養基（連同未附著的死細胞）吸出並用新鮮培養基更換。將細胞維持達48小時（其中在24小時時培養基的至少一次更換）。動物程序按照美國國家科學院（National Academy of Sciences）的人文關懷標準進行。

葡萄糖代謝

【0216】在本申請案之化合物（例如，OCA）存在或不存在下與至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）一起培養18小時之後測量肝細胞葡萄糖代謝的參數。葡萄糖利用被測定為在[5-³H]-葡萄糖（6.5 μ Ci/mL）存在下培養肝細胞持續2小時之後氘化水（就脂肪酸氧化實驗而言）的產生。在每個週期過程中在有或無100 nmol/L胰島素的情況下預培養30分鐘之後再5分鐘內測定2-[³H]-去氧葡萄糖（DOG；10 μ mol/L，0.5 μ Ci/mL）的攝取（佩爾多莫等人，生物化學雜誌279，27177（2004））。D-[¹⁴C]-葡萄糖（2 μ Ci/mL）併入肝醣在胰島素不存在或存在下經1小時進行測量（佩爾多莫等人2004）。

實施方式9：評價測試物品對肝細胞和小鼠中的葡萄糖代謝的作用

細胞培養和暫態轉染

【0217】如所描述（王（Wang）等人，分子內分泌學（*Mol. Endocrinol.*）22，1622（2008）），將人肝母細胞瘤細胞（HepG2）接種到6孔板（ 1×10^6 個細胞/孔）中並在完全培養基[供應有10%（vol/vol）失活胎牛血清和1%（vol/vol）抗生素-抗真菌劑的高葡萄糖杜氏改良的伊格爾氏培養基（具有L-穀胺醯胺）]中生長。第二天，將細胞用本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）進行處理。在處理之後18小時，將該等細胞用TPA（50 nM）、LPS（1 μ g/mL）或TNF- α （10 ng/mL）進行處理，且然後在6小時培養後收集以用於RNA分離。

【0218】使用Lipofectamine 2000（英傑公司，卡爾斯巴德，加利福尼亞州）進行HepG2細胞的暫態轉染。除非另外陳述，否則將細胞用本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）預處理18小時。用或不用LPS或TPA處理細胞。在6小時培養後，收獲細胞，

並且根據製造商的說明書（普洛麥格公司（Promega），麥迪森（Madison），威斯康辛州（WI）），使用雙螢光素酶報告基因測定系統來測定螢光素酶活性。將螢光素酶活性經由對照胸苷激酶驅動的海腎螢光素酶質粒 pRL-TK 的共轉染標準化。資料被表示為與非刺激組的活化的相對倍數活化。

原代小鼠肝細胞培養

【0219】如所描述（黃（Huang）等人，分子內分泌學 18，2402（2004）；黃等人，臨床研究雜誌（*J. Clin. Invest.*）113, 137（2004）；喬（Qiao）等人，細胞分子生物學（*Mol. Biol. Cell*）12，2629（2001））從8週齡小鼠製備原代肝細胞。將細胞用本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）進行處理。在處理之後18小時，將細胞用LPS（20 μ g/mL）、TPA（150 nM）或TNF- α （10 ng/mL）進行處理，且然後在6小時培養後收集以用於RNA分離。

RNA分離和定量即時聚合酶鏈式反應

【0220】如所描述（楊（Yang）等人，癌症研究（*Cancer Res.*）67，863（2007））進行從HepG2細胞、原代小鼠肝細胞和小鼠肝分離總RNA和定量即時聚合酶鏈反應（PCR）。 β -肌動蛋白的擴增用作內部參考。

動物

【0221】除非另有說明，否則使用八週齡小鼠。將野生型和FXR^{-/-}小鼠在標準12:12-小時光照/黑暗循環下維持在無病原體的動物設施中。將小鼠飼餵標準齧齒動物食物並隨意飲水。將八週齡雌性野生型和FXR^{-/-}小鼠禁食過夜，且然後腹膜內注射單劑量的人LPS（20 mg/kg）或磷酸緩衝鹽水（PBS）或本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些），隨後隨意給水。在注射後六小時，將小鼠殺死，並且

第 75 頁，共 84 頁(發明說明書)

除去血液和肝以用於進一步分析。所有程序遵循美國國立衛生研究院實驗室動物的護理和使用指南。

實施方式10：評價測試物品在動物模型中的作用

【0222】胰島素抗性係將脂肪組織（AT）功能障礙與代謝綜合症（MetS）中的肝炎症和脂肪變性相聯繫的推定關鍵潛在機制。已證明OCA改善胰島素抗性和具有MetS之高脂肪飲食（HFD）誘導的兔模型中內臟AT（VAT）的量顯著減少的代謝概況。藉由免疫組織化學、西方墨點法和RT-PCR對VAT的分析表明，相較於對照飲食的兔，體內OCA給藥使脂肪細胞大小、低氧以及脂滴包被蛋白（perilipin）和胞質胰島素調控的葡萄糖轉運蛋白GLUT4（SLC2A4）的表現正常化，該等蛋白在分離自HFD兔的VAT中顯著增加。體內OCA給藥還使HFD兔中脂肪變性和炎症標誌物的表現正常化。

MetS兔模型

【0223】如先前所描述獲得MetS的HFD誘導的兔模型（菲利皮等人，性醫學雜誌6，3274（2009））。稱重約3 kg的雄性紐西蘭白兔被隨機編號並分配到兩個不同的組：未處理組，飼餵對照飲食（CON）；或處理組，飼餵HFD（0.5%膽固醇和4%花生油），持續12週。將HFD兔亞組用本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）進行處理。所使用的OCA得劑量可以基於在齧齒動物中進行的功效和藥物動力學分析進行選擇（佩里恰裡（Pellicciari）等人，藥物化學雜誌（*J. Med. Chem.*）45，3569（2002））。另外的治療劑（如在此所述的那些）的劑量也可以基於如在文獻中公佈的在動物（例如，小鼠、大鼠、兔、豬）中的功效和藥物動力學分析進行選擇。

【0224】在所有組中在基線和在第12週從耳緣靜脈獲得血液樣品。平均動脈壓測量和口服葡萄糖耐量測試係在殺死之前進行的，如先前所述（菲利

第 76 頁，共 84 頁(發明說明書)

皮等人，2009）。在處理12週之後，使用致死劑量的戊巴比妥（100 mg/kg）將兔殺死，並且小心地切除肝、VAT（積聚在腸彎與腸系膜之間）以及膽囊的試樣，稱重、收集且加工以用於隨後分析。對來自所有兔組的VAT樣品進行加工以用於分離前脂肪細胞。如先前所述進行生物化學和激素血清分析(菲利普等人2009，莫雷利等人，類固醇生物化學和分子生物學雜誌132，80（2012），Vignozzi等人，內分泌學雜誌212，71（2012））。

【0225】爲了評價MetS的作用，設計了將以下因素中的一個或多個的存在作爲虛變數考慮在內的演算法：高血糖症、高甘油三酯水平、高膽固醇水平、血壓升高以及內臟脂肪積聚。每個因素的截斷值藉由所分析參數的平均值 ± 2 S.D.導出，如在CON兔中所測量。三個或更多個因素的陽性指示MetS。

樣本大小

【0226】假定CON組中2.5%MetS的發生概率並且HFD組中60%的概率（菲利普等人2009；Vignozzi等人，性醫學雜誌8，57（2011）；Vignozzi等人2012；馬內斯基等人，內分泌學雜誌215，347（2012）；莫雷利等人2012；莫雷利等人，前列腺（*Prostate*）73，428（2013）），使用74隻兔（其中該等組之間的分配比爲1：1）將允許在區分兩個治療組之間MetS的發展速率的差異方面接近100%的功效（power）。假定在飼餵HFD的組中MetS的發生概率等於60%，且在飼餵HFD和本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）的組中概率爲10%（Vignozzi等人2011，莫雷利等人2012），使用54隻兔（其中分配比爲2：1）將允許在區分兩個處理組之間MetS的發展速率的差異方面約95%的功效。

VAT的組織形態測量分析

【0227】將VAT試樣藉由蘇木精和曙紅染色進行分析以便測量脂肪細胞直徑，如先前所描述（馬內斯基等人2012）使用配備有免費軟體程序ImageJ（NIH，貝塞斯達（Bethesda），馬里蘭州（MD），美國）的尼康Microphot-FXA顯微鏡（尼康，東京，日本），從而考慮脂肪細胞係規則球形的。

低氧檢測和免疫組織化學

【0228】在殺死之前1小時使用腹膜內注射的生物還原藥物鹽酸哌莫硝唑（低氧探針-1, 60 mg/kg）分析VAT氧合，如先前所描述（馬內斯基等人2012，莫雷利等人2012，2013，Vignozzi等人2012）。

用於西方墨點法分析的總部分和膜/細胞溶質部分的製備

【0229】對於來自VAT樣品的蛋白質提取，將冷凍的組織在液氮中研磨並分成兩個等分部分：一個用於總蛋白質提取並且另一個用於膜/細胞溶質製劑。根據製造商的說明書，使用ProteoExtract亞細胞蛋白質組提取套組（Calbiochem-Merck KGaA，達姆施塔特（Darmstadt），德國）製備膜和細胞溶質部分。用BCA試劑（皮爾斯，羅克福德，伊利諾州，美國）定量蛋白質提取物，並且藉由10% SDS - PAGE解析15 mg的每種樣品。如先前所描述（馬內斯基等人2012）用抗葡萄糖轉運蛋白4型（GLUT4）抗體（Upstate生物技術公司，普萊西德湖（Lake Placid），紐約，美國）和抗脂滴包被蛋白抗體（聖克魯斯生物技術公司（Santa Cruz Biotechnology, Inc.））進行西方墨點法分析。藉由用抗肌動蛋白抗體（聖克魯斯生物技術公司）對膜進行再探測來驗證相等蛋白質負載。使用Adobe Photoshop軟體進行帶強度的密度測定法分析。

肝組織學

【0230】肝脂肪變性係藉由肝切片的油紅O染色評定的。將冷凍切片在一低溫恆溫器中切割，並在室溫（RT）下固定在4%多聚甲醛中持續20分鐘。

第 78 頁，共 84 頁(發明說明書)

然後，將該等切片用異丙醇處理2-5分鐘，並且用油紅O染色20分鐘。藉由用水（3：2）稀釋儲備溶液（100 ml的異丙醇中的0.3 g油紅O）來製備油紅O。在油紅O染色之後，將該等切片在水中洗滌數次並用蘇木精和曙紅染色以便突出顯示肝細胞核。最後，對該等切片進行拍照，並且使用Adobe Photoshop軟體在背景減除之後進行油紅O陽性的電腦輔助定量。

肝切片中的炎症標誌物的免疫組織化學

【0231】將肝切片與針對各種炎症標誌物（例如，TNF α 、Cd68、Il-6、Il-1b以及Il-12）的第一抗體在48°C下培養過夜。將該等切片在PBS中漂洗，並且與生物素化的第二抗體培養，且然後與鏈黴素-生物素-過氧化物酶複合物（Ultravision大體積檢測系統抗多價，視覺實驗室公司（Lab Vision），弗里蒙特（Fremont），加利福利亞州，美國）培養。將反應產物用3',3'-二胺基聯苯胺四鹽酸鹽作為發色團（西格瑪-奧德里奇（Sigma-Aldrich）公司）顯影。藉由省略第一抗體進行對照實驗。對載玻片進行評價並用尼康Microphot-FXA顯微鏡拍照。使用Adobe Photoshop軟體在背景減除之後進行針對炎症標誌物的染色的電腦輔助定量。

兔內臟脂肪前脂肪細胞的分離、表徵和分化

【0232】如先前所述進行來自VAT的兔前脂肪細胞（rPAD）的分離（馬內斯基等人2012）。簡言之，將VAT樣品用1 mg/ml 2型膠原酶（西格瑪-奧德里奇公司）消化1小時，用紅細胞裂解緩衝液（155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃和0.1 mM EDTA；在室溫下10分鐘）處理，然後在2000 g下在室溫下離心10分鐘，再懸浮於完全培養基（含10%胎牛血清（FBS）、100 mg/ml鏈黴素、100 U/ml青黴素、2 mM L-穀胺醯胺以及1 mg/ml兩性黴素-B；西格瑪-奧德里奇公司）中，並通過150 mm篩網過濾器進行過濾以除去碎片。最後，將該等細胞在37°C下在95%空氣-5% CO₂的加濕氣氛中在完全培養基中培

第 79 頁，共 84 頁(發明說明書)

養。在培養4-5天之後在第0代(P0)獲得亞匯合(90%的細胞培養皿)和均勻的成纖維細胞樣細胞群體。使該等亞匯合的細胞胰蛋白酶化並接種在細胞培養皿(P1)中。對於所有實驗，僅使用P1培養物，並且對於每個實驗組使用至少三種不同的rPAD製劑重複該等實驗。如先前所述(馬內斯基等人2012)，用以下軛合的單克隆抗體藉由流動式細胞術對rPAD進行表徵：CD34-PE、CD45-FITC、CD31-FITC、CD14-PE、CD90-PE、CD106-FITC (BD Pharmingen, 聖地牙哥(San Diego), 加利福利亞州, 美國)和CD105-PE (安素公司(Ancell), 貝波特(Bayport), 明尼蘇達州(MN), 美國)。在匯合(時間0)後2天藉由將rPAD暴露於在補充5%剝離FBS的DMEM中的含有5 mg/ml胰島素、1 mM地塞米松和0.5 mM 3-異丁基-1-甲基黃嘌呤(IBMx)之分化混合物(DIM)來誘導rPAD的分化。每48小時更換培養基，且然後將細胞轉移到含有5 mg/ml胰島素的培養基中持續48小時。

葡萄糖攝取

【0233】如先前所描述測量rPAD的葡萄糖攝取(馬內斯基等人2012)。將DIM暴露的rPAD在無血清培養基中培養24小時，隨後在於無葡萄糖的Krebs磷酸鹽緩衝液(2.5 mmol Ca_2C 和1 mg/ml BSA)中稀釋的增加濃度的胰島素(1、5、10以及50 nM)中培養，以便評價胰島素依賴性刺激。在培養期結束時，將rPAD與 ^3H -2-去氧-D-葡萄糖(16 mM (1mCi/ml)；ICN製藥公司，科斯塔梅薩山(Costa Mesa)，加利福利亞州，美國)進一步培養5分鐘。將細胞用PBS洗滌，並用NaOH 0.5 M溶解，且藉由閃爍光譜測定使用 β 計數器(鉑金-埃爾默公司(Perkin-Elmer))測量所結合的放射性。將資料關於蛋白質含量標準化。

統計分析

【0234】如所指定對於n個實驗將結果表示為平均值+ S.E.M.。用單向ANOVA檢驗、接著杜凱氏-克萊默事後分析（Tukey - Kramer *post hoc* analysis）進行統計分析，以便評價該等組之間的差異，並且 $P < 0.05$ 被認為係顯著的。使用斯皮爾曼（Spearman）的方法評定相關性，並且針對Windows 15.0用社會科學統計套裝軟體（SPSS公司）進行統計分析。在任何適當的情況下，逐步多元線性回歸用於多變數分析。使用電腦程序ALLFIT計算半最大反應有效濃度（ EC_{50} ）值和最大作用（ E_{max} ）值。

實施方式11：評價測試物品在動物模型中的作用

實驗動物和飲食

【0235】將動物在22°C下在12:12-小時光照-黑暗循環中單獨圈養在標準籠子中。約7週齡的雄性C57BL6(B6)或 Lep^{ob}/Lep^{ob} 小鼠購自傑克遜實驗室(巴爾港, ME)。測試飲食來源於研究飲食公司（Research Diets）（新不倫瑞克（New Brunswick），新澤西州（NJ））。為了誘導NASH，對由高脂肪（40%千卡）和高果糖（22 wt%）構成的飲食進行了測試，其中脂肪的來源係反式脂肪（普利邁克斯（Primex）部分氫化的植物油起酥油，目錄號D09100301）。無果糖或膽固醇的低脂肪飲食（10%千卡/脂肪）用作對照飲食（目錄號D09100304）。HTF飲食被認為係在誘導NASH方面優越的，並且用於隨後研究中。

研究和藥物給予

【0236】為了表徵按該等飲食時NASH的發展，分別將 Lep^{ob}/Lep^{ob} 或B6小鼠維持低脂肪飲食（LFD），高反式脂肪、高果糖、高膽固醇（HTF）飲食，抑或高豬油脂肪、高果糖、高膽固醇飲食（HLF）持續8週或12週。將小鼠皮下植入遞送媒介物（無菌水中的50% DMSO）抑或本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）的一個

單個滲透微型泵（型號2004；Alzet，庫比蒂諾（Cupertino），加利福利亞州）。此外或可替代地，可以經由口服胃管灌食法每日一次向小鼠給予媒介物抑或本申請案之醫藥組合物。每週測量體重。藉由NMR（埃科醫療系統公司（Echo Medical Systems），休斯頓（Houston），德克薩斯州（TX））在基線（泵植入前一天）和終止時測定身體組成。

【0237】爲了評定體重損失對肝終點的影響，可以重複在如上所述暴露於LFD或HTF飲食的*Lep^{ob}/Lep^{ob}*小鼠中的初始研究。在8週LFD或HTF飲食後，將所有小鼠口服給予本申請案之化合物（例如，OCA）連同至少一種另外的治療劑（例如，在此所述的那些）持續8週或12週。

【0238】在終止時，將肝組織切下並固定在10%中性緩衝的福馬林中（在室溫下至少7天）。然後將肝組織石蠟包埋、切片並固定且用蘇木精和曙紅染色。爲了視覺化纖維化，將另一組切片用天狼星紅（Sirius Red）（西格瑪-奧德里奇公司，聖路易斯，密蘇里州）進行染色。將切片首先用維格特鐵蘇木精染色，接著比布列希猩紅（Biebrich scarlet）、磷鎢酸/磷鉬酸和苯胺藍處理。根據標準方案，將第二組切片使用靶向巨噬細胞標誌物Mac-2之抗體（西達連實驗室（Cedarlane Laboratories），伯林頓（Burlington），北卡羅來納州（NC））免疫染色。由不知道處理條件的病理學家進行所有組織學分析。

【0239】使用改編自福爾奇（Folch）等人（生物化學雜誌226，497（1957））的方案從肝提取總肝脂質。將大約0.5 g冷凍肝組織在10 ml的2：1氯仿/甲醇溶液中均質化。將勻漿使用不含脂肪的紙過濾並集中到預先稱重的15-ml玻璃離心管中。接著，添加另外5 ml 2：1氯仿/甲醇溶液，然後添加2.5 ml 0.9% NaCl。隨後隨後將過濾的提取物混合並在2,000 rpm、10°C下離心5分

鐘。將水層丟棄，並且將管用氮沖洗直到脂質沈澱乾燥。將含有脂質沈澱的該管重新稱重，並計算每克起始肝所提取得總脂質。

【0240】對於西方墨點法分析，將切除的肝組織稱重，然後在液氮中快速冷凍並儲存在-80 °C下直到加工。如下從每個肝的片段分離蛋白質。將冷凍的肝組織在乾冰上壓碎，且然後在具有蛋白酶抑制劑（目錄號05892791001；羅氏完全片劑（Roche Complete Tablet）；和0.6 mM PMSF）的裂解緩衝液中均質化。用BCA蛋白質測定套組（皮爾斯，羅克福德，伊利諾州）測量澄清的上清液的蛋白質濃度。按照生產商的方案（英傑公司（Invitrogen），卡爾斯巴德（Carlsbad），加利福尼亞州），在還原的Nupage凝膠上分離肝組織溶解產物(50 µg)並轉移至PVDF膜。將膜在50-和60-kDa標記之間切割並用5% Blotto封閉；將上半部分用抗1型膠原（1:350；目錄號NBP1-30054；諾維斯生物製劑公司（Novus Biologicals），利特爾頓（Littleton），科羅拉多州（CO））探測，並且出於標準化，將下半部分用抗GAPDH（1:10,000；辣根過氧化物酶軛合的；目錄號3683；細胞信號傳導技術公司（Cell Signaling Technology），丹佛斯（Danvers），麻塞諸塞州）進行探測。在與辣根過氧化物酶抗兔抗體培養後，用增強的化學發光（皮爾斯）檢測蛋白質表現，並且使用FluorChem系統（細胞生物科學公司（Cell Biosciences），聖克拉拉（Santa Clara），加利福尼亞州）進行密度測定。

組織基因表現

【0241】將肝在終止時切除，稱重，在液氮中快速冷凍，並儲存（-80°C）。使用TRI試劑（Ambion，奧斯丁（Austin），德克薩斯州（TX））與RNeasy柱（凱傑公司（Qiagen），查茨沃思（Chatsworth），加利福尼亞州）提取總RNA，並且使用RETROscript RT-PCR逆轉錄系統（Ambion）產生cDNA。

第 83 頁，共 84 頁(發明說明書)

定量即時PCR(ABI PRISM 7900序列檢測系統;應用生物系統公司(Applied Biosystems);福斯特城(Foster City),加利福利亞州)用於參與NASH病理學的基因(例如,參與脂肪變性、炎症和纖維化的基因)。可以使用按需Taqman基因表現測定和通用PCR主混合物(應用生物系統公司)進行測定。

血漿激素和代謝物分析

【0242】使用奧林巴斯AU400e生物分析儀(奧林巴斯美國診斷公司,中心穀,賓夕法尼亞州)測量血漿葡萄糖、甘油三酯、總膽固醇、ALT以及天冬胺酸胺基轉移酶(AST)水平。將血漿樣品用PBS 1:10稀釋以用於檢測標準曲線範圍內的ALT和AST。使用可商購的ELISA根據製造商的說明書(密理博,比勒利卡(Billerica),麻塞諸塞州)測量總血漿脂聯素。

【符號說明】

【0243】

LEAN-CHOW 瘦食物

Lira 利拉魯肽

Met 二甲雙胍

NAS 非酒精性脂肪肝病(NAFLD)活動度評分

OCA 奧貝膽酸

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含一FXR激動劑、至少一種另外的治療劑以及視情況一種或多種藥學上可接受的載體，其中該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。

【第2項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑降低葡萄糖水平。

【第3項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑刺激胰島素分泌。

【第4項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑提高胰島素敏感性。

【第5項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係胰島素或一種胰島素類似物。

【第6項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係胰腺 β 細胞中的ATP敏感性 K^+ 通道之抑制劑。

【第7項】 如申請專利範圍第6項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係磺醯脲。

【第8項】 如申請專利範圍第6項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑選自美格列奈、瑞格列奈、納格列奈、米格列奈以及利諾格列。

【第9項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係一腸促胰島素模擬物。

【第10項】 如申請專利範圍第9項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係GLP-1或其GLP-1受體激動劑。

【第11項】 如申請專利範圍第9項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係GIP或其類似物。

【第12項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係二肽基肽酶-4的抑制劑。

【第13項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係雙胍。

【第14項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係膽汁酸螯合劑。

【第15項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係促進葡萄糖的代謝之藥劑。

【第16項】 如申請專利範圍第15項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係葡萄糖激酶活化劑。

【第17項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係阻斷葡萄糖的腎重吸收之藥劑。

【第18項】 如申請專利範圍第17項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係SGLT-2抑制劑。

【第19項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係減少腸中的葡萄糖吸收之藥劑。

【第20項】 如申請專利範圍第19項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係 α -葡萄糖苷酶抑制劑。

【第21項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係減慢胃排空之藥劑。

【第22項】 如申請專利範圍第21項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係澱粉不溶素或其類似物。

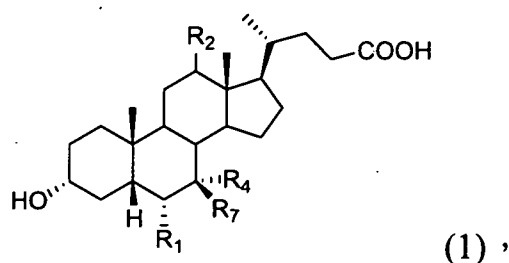
【第23項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係微粒體甘油三酯轉移蛋白抑制劑。

【第24項】如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑選自溴隱亭、苯氟雷司以及托瑞司他。

【第25項】如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係降低醣皮質激素的濃度之藥劑。

【第26項】如申請專利範圍第25項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係11 β -HSD1抑制劑。

【第27項】如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中該FXR激動劑係具有式I之化合物：



或其藥學上可接受的鹽或胺基酸銜合物，其中：

R₁係氫或未取代的C₁-C₆烷基；

R₂係氫或 α -羥基；

R₄係羥基或氫；並且

R₇係羥基或氫。

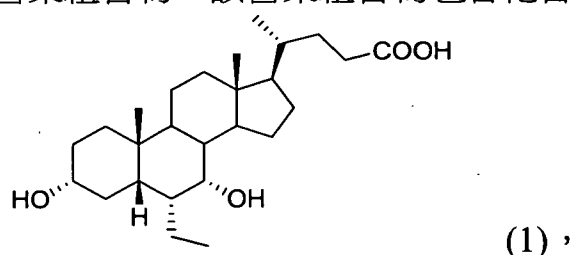
【第28項】如申請專利範圍第27項所述之醫藥組合物，其中R₁係未取代的C₁-C₆烷基。

【第29項】如申請專利範圍第28項所述之醫藥組合物，其中R₁係甲基、乙基或丙基。

【第30項】如申請專利範圍第29項所述之醫藥組合物，其中R₁係乙基。

【第31項】如申請專利範圍第27項所述之醫藥組合物，其中R₄係羥基並且R₇係氫。

【第32項】 一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含化合物1：



或其藥學上可接受的鹽或胺基酸氈合物、至少一種另外的治療劑以及視情況一種或多種藥學上可接受的載體，其中該至少一種另外的治療劑降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性。

【第33項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑降低葡萄糖水平。

【第34項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑刺激胰島素分泌。

【第35項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑提高胰島素敏感性。

【第36項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係胰島素或一胰島素類似物。

【第37項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係胰腺β細胞中的ATP敏感性K⁺通道之抑制劑。

【第38項】 如申請專利範圍第37項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係磺醯脲。

【第39項】 如申請專利範圍第37項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑選自美格列奈、瑞格列奈、納格列奈、米格列奈以及利諾格列。

【第40項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係一腸促胰島素模擬物。

【第41項】 如申請專利範圍第40項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係GLP-1或其GLP-1受體激動劑。

【第42項】 如申請專利範圍第40項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係GIP或其類似物。

【第43項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係二肽基肽酶-4之抑制劑。

【第44項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係雙胍。

【第45項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係膽汁酸螯合劑。

【第46項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係促進葡萄糖的代謝之藥劑。

【第47項】 如申請專利範圍第46項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係葡萄糖激酶活化劑。

【第48項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係阻斷葡萄糖的腎重吸收之藥劑。

【第49項】 如申請專利範圍第48項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係SGLT-2抑制劑。

【第50項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係減少腸中的葡萄糖吸收之藥劑。

【第51項】 如申請專利範圍第50項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係 α -葡萄糖苷酶抑制劑。

【第52項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係減慢胃排空之藥劑。

【第53項】 如申請專利範圍第52項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係澱粉不溶素或其類似物。

【第54項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係微粒體甘油三酯轉移蛋白抑制劑。

【第55項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑選自溴隱亭、苯氟雷司以及托瑞司他。

【第56項】 如申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係降低醣皮質激素的濃度之藥劑。

【第57項】 如申請專利範圍第56項所述之醫藥組合物，其中該至少一種另外的治療劑係11 β -HSD1抑制劑。

【第58項】 如申請專利範圍第1或申請專利範圍32項所述之醫藥組合物在製造用於治療或預防非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 或非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的藥劑中之用途。

【第59項】 如申請專利範圍第58項所述之用途，其中該NAFLD或NASH與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素的分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關。

【第60項】 如申請專利範圍第1或申請專利範圍32項所述之醫藥組合物在製造用於治療或預防與血液中葡萄糖的水平升高、胰島素分泌減少和/或胰島素敏感性降低相關之疾病或病狀的藥劑中之用途。

【第61項】 如申請專利範圍第60項所述之用途，其中該疾病或病狀選自NAFLD、NASH、高血糖症、糖尿病、肥胖症以及胰島素抗性。

【第62項】 降低血液中的葡萄糖水平、刺激胰島素分泌和/或提高胰島素敏感性之用途，該用途包括向有需要的受試者給予治療有效量的如申請專利範圍第1項或申請專利範圍第32項所述之醫藥組合物。