

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA TERAPIA COMBINADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una cantidad de afecciones vienen acompañadas de concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en sangre, tales como colesterol y triglicéridos. Entre ellas se incluyen la diabetes tipo II, la cirrosis biliar primaria (PBC), la colangitis esclerosante primaria (PSC), diferentes estados de hepatitis crónica (Hepatitis B y C), NASH (esteatohepatitis no alcohólica), y enfermedades arteriales que incluyen enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular arterial, enfermedad vascular periférica, aneurismas de aorta y afecciones ateroscleróticas de carótidas. En el pasado se han usado diferentes técnicas para disminuir los lípidos para tratar y para prevenir los eventos vasculares (tales como insuficiencia cardíaca, embolismo, infartos y accidentes cerebrovasculares) que acompañan a estados hiperlipidémicos. Dichos tratamientos han incluido cambios en la dieta y el control de niveles elevados de triglicéridos y colesterol circulantes en sangre. Los últimos han sido tratados en general de manera farmacológica y últimamente con diferentes "estatinas". Entre los agentes terapéuticos usados para el tratamiento de afecciones con niveles elevados de lípidos se incluyen diferentes derivados de ácido fíbrico. Algunos derivados de ácido fíbrico más antiguos que incluyen clofibrato han tenido un lugar pasajero en el tratamiento de afecciones asociadas con lípidos elevados, pero más recientemente los nuevos fibratos que incluyen fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, e incluso más recientemente fibratos que

contienen piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperidin-3-eno, y piperazina se han unido a las categorías de terapias antilipídicas. Estas moléculas más nuevas tienen propiedades promisorias para reducir el colesterol y los triglicéridos. Sin embargo, en algunas situaciones un derivado de ácido fíbrico por sí solo no es adecuado para controlar un nivel severo de hiperlipidemia que se presenta en muchos pacientes. El perfil de efectos secundarios de un derivado de ácido fíbrico también puede mejorarse por una reducción en la dosis tal como en presencia de una terapia combinada.

En consecuencia, existe una necesidad de contar con una terapia mejorada para el tratamiento de afecciones que incluyen concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, tales como colesterol y triglicéridos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1A es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con Sirius-red de ratones BDL control.

La Figura 1B es una fotomicrografía representativa de una sección de hígado teñida con Sirius-red de ratones BDL tratados con vehículo.

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

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

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

5 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra el área positiva para Sirius-red (%) en ratones BDL tratados con OCA y atorvastatina solos y combinados.

La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra el número de focos de células inflamatorias del tratamiento con OCA, fenofibrato en dosis baja solos y combinados en
10 ratones APOE*3Leiden.CETP.

La Figura 3B es un gráfico de barras que muestra el número de focos de células inflamatorias del tratamiento con OCA, fenofibrato en dosis alta solos y combinados en
15 ratones APOE*3Leiden.CETP.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra los efectos de OCA y atorvastatina solos y combinados sobre el estadio de fibrosis en ratones leptina-ob/ob.

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

La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra el cambio en los niveles de triglicéridos en plasma respecto al basal en ratones leptina-ob/ob tratados con OCA y
25 atorvastatina solos y combinados.

La Figura 6A es un gráfico de barras que muestra un análisis de enriquecimiento de las vías canónicas de HFC+OCA contra ratones APOE*3Leiden.CETP con HFC sostenido.

La Figura 6B es un gráfico de barras que muestra un
30 análisis de enriquecimiento de las vías canónicas de

HFC+OCA+fenofibrato en dosis baja contra ratones APOE*3Leiden.CETP con HFC sostenido.

5 La Figura 7A es un diagrama de venn que muestra el número de novedosos genes expresados de manera diferencial regulados por la combinación de OCA + fenofibrato en dosis baja respecto a monoterapia en ratones APOE*3Leiden.CETP.

10 La Figura 7B es un gráfico de barras que muestra el enriquecimiento de vías de señalización de genes regulados por la combinación de OCA + fenofibrato en dosis baja respecto a monoterapia en ratones APOE*3Leiden.CETP.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de OCA y una combinación de una o más estatinas sobre el LDL-colesterol en humanos.

15 SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente solicitud se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, y (iii) opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

25 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos un fibrato, y opcionalmente (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

30 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos un agente reductor de lípidos, y opcionalmente (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente

aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

5 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos una estatina, y opcionalmente (iii) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

10 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, (iii) por lo menos un agente reductor de lípidos, y opcionalmente (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de
15 FXR.

La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer compuesto, (ii) por lo menos un fibrato, (iii) por lo menos un agente reductor de lípidos, y opcionalmente (iv) uno o
20 más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

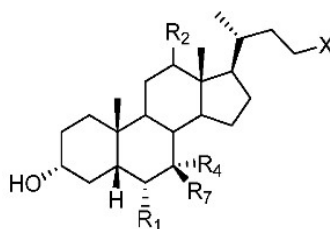
La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer
25 compuesto, (ii) por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, (iii) por lo menos una estatina, y opcionalmente (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

30 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) un primer

compuesto, (ii) por lo menos un fibrato, (iii) por lo menos una estatina, y opcionalmente (iv) uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR.

La presente invención también se relaciona con el uso terapéutico de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

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



(A),

o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, en donde R_1 , R_2 , R_4 , R_7 , y X son como se define en la presente.

La presente invención también se relaciona con métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por FXR o una enfermedad o afección en la cual están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, reduciendo el nivel de una enzima hepática, o inhibiendo o revirtiendo la fibrosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita.

La presente invención también se relaciona con el uso de una composición farmacéutica de la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por FXR o una enfermedad o afección en la cual están

involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, reduciendo el nivel de una enzima hepática, o inhibiendo o revirtiendo la fibrosis.

5 La presente invención también se relaciona con el uso de una composición farmacéutica de la presente invención en la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por FXR o una enfermedad o afección en la cual están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre,
10 reduciendo el nivel de una enzima hepática, o inhibiendo o revirtiendo la fibrosis.

Las composiciones y métodos de la presente invención abordan estas necesidades no cumplidas en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en el cual están involucradas concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, tales como colesterol y triglicéridos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente solicitud está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de
25 FXR.

En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-alfa. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica
30 comprende por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y

delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y gamma. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-alfa y por lo menos un agonista de PPAR-delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-alfa y por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-delta y por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma. En un ejemplo, la composición farmacéutica comprende por lo menos un agonista de PPAR-alfa, por lo menos un agonista de PPAR-delta, y por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta. En un ejemplo, el agonista de PPAR-alfa es un fibrato, tales como los fibratos descritos en la presente. En un ejemplo, el agonista de PPAR-delta es ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil)sulfanil]-2-metilfenoxi}acético (también conocido como GW501516, GW1516 y "Endurabol"), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometilfenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsilfanil]-fenoxi}-acético, o ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metil fenoxi]-acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxi]-2-metilpropanoico (también conocido como GFT505). En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y gamma es aleglitazar (ácido (2S)-2-metoxi-3-[4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)etoxi]-7benzotiofenil]propanoico), muraglitazar

(N-[(4-metoxifenoxi)carbonil]-N-{4-[2-(5metil-2-fenil-1,3-oxazol-4-il)etoxi]bencil}glicina), tesaglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico), o saroglitazar (ácido (2S)-2-etoxi-3-[4-(2{2-metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol-1-il}etoxi)fenil]propanoico), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxi]-2-metilpropanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente solicitud también está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, por lo menos un fibrato, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR. El agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR. El fibrato puede ser cualquier fibrato. En un ejemplo, el fibrato se selecciona entre cualquier fibrato de los que se describen en la presente.

La presente solicitud también está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto, por lo menos un agente reductor de lípidos, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de FXR. El agonista de FXR puede ser cualquier agonista de FXR. El agente reductor de lípidos puede ser cualquier agente reductor de lípidos. En un ejemplo, el agente reductor de lípidos se selecciona

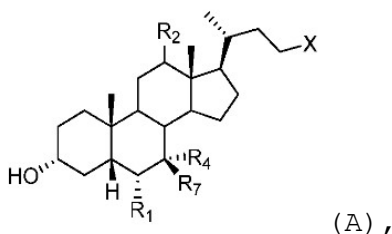
entre los agentes reductores de lípidos que se describen en la presente.

La presente solicitud también está dirigida a una
composición farmacéutica que comprende un primer compuesto,
por lo menos una estatina, y opcionalmente uno o más
vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer
compuesto es un agonista de FXR. El agonista de FXR puede
ser cualquier agonista de FXR. La estatina puede ser
cualquier estatina. En un ejemplo, la estatina se
selecciona entre las estatinas que se describen en la
presente.

La presente solicitud también está dirigida a una
composición farmacéutica que comprende un primer compuesto,
por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-
delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y
gamma, por lo menos un agente reductor de lípidos, y
opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente
aceptables, en donde el primer compuesto es un agonista de
FXR. La presente solicitud también está dirigida a una
composición farmacéutica que comprende un primer compuesto,
por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-
delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y
gamma, por lo menos una estatina, y opcionalmente uno o más
vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el primer
compuesto es un agonista de FXR. En un ejemplo, el agonista
de PPAR-alfa es un fibrato, tales como los fibratos que se
describen en la presente. En un ejemplo, el agonista de
PPAR-delta es ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil)sulfanil]-2-
metilfenoxi}acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-

trifluorometilfenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsilfanil]-
 fenoxi}-acético, o ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-
 (trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-
 5 metil fenoxi]-acético, o una sal farmacéuticamente
 aceptable de los mismos. En un ejemplo, el agonista dual de
 PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-
 (metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-
 metilpropanoico. En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-
 10 alfa y gamma es aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar, o
 saroglitazar, o una sal farmacéuticamente aceptable de los
 mismos. En un ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y
 delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]3-
 oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico, o una sal
 15 farmacéuticamente aceptable del mismo. En un ejemplo, el
 agente reductor de lípidos se selecciona entre los agentes
 reductores de lípidos de los que se describen en la
 presente. En un ejemplo, la estatina se selecciona entre
 las estatinas que se describen en la presente.

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



25 o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con
 aminoácido del mismo, en donde:

R₁, es hidrógeno o C₁-C₆ alquilo no sustituido;

30 R₂, es hidrógeno o α-hidroxilo;

X es C(O)OH, C(O)NH(CH₂)_mSO₃H, C(O)NH(CH₂)_nCO₂H u OSO₃H;

R_4 es hidroxilo o hidrógeno;

R_7 es hidroxilo o hidrógeno;

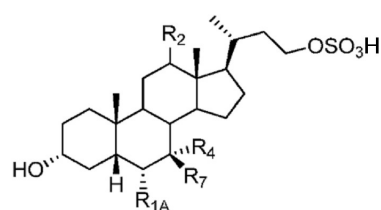
m es 1, 2 o 3; y

n es 1, 2 o 3.

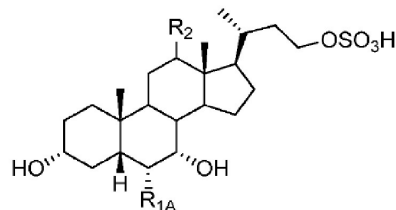
5

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

10



(I) y



(IA)

15

o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, en donde

R_{1A} es hidrógeno o C₁-C₆ alquilo no sustituido;

R_2 , es hidrógeno o α -hidroxilo;

R_4 es hidroxilo o hidrógeno;

y R_7 es hidroxilo o hidrógeno.

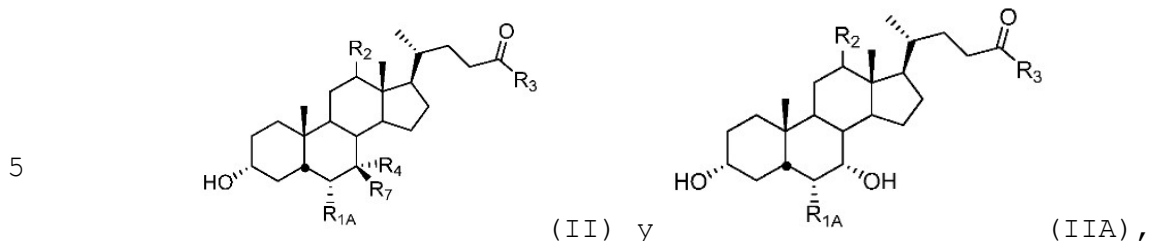
20

En un aspecto, el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, el primer compuesto es una sal de sodio de Fórmula I o IA. En otra forma de realización, el primer compuesto es una sal de amonio de un compuesto de la Fórmula I o IA. En otra forma de realización, el primer compuesto es una sal de trietil amonio de un compuesto de Fórmula I o IA.

25

En aún otro ejemplo, el primer compuesto de la composición farmacéutica se selecciona entre las Fórmulas II y IIA:

30



o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, en donde:

- 10 R_{1A} es hidrógeno o C_1 - C_6 alquilo no sustituido;
 R_2 , es hidrógeno o α -hidroxilo;
 R_3 es hidroxilo, $NH(CH_2)_mSO_3H$ o $NH(CH_2)_nCO_2H$;
 R_4 es hidroxilo o hidrógeno;
 R_7 es hidroxilo o hidrógeno;
 m es 1, 2 o 3; y
15 n es 1, 2 o 3.

En un ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, I, IA, II o IIA, en donde R_2 , es hidrógeno.

20 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde R_1 , es C_1 - C_6 alquilo no sustituido. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde R_1 , es C_1 - C_3 alquilo no sustituido. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde R_1 , se selecciona entre metilo, etilo, y propilo. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde R_1 , es etilo.

25 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula I, IA, II, o IIA, en donde R_{1A} es C_1 - C_6 alquilo no sustituido. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula I, IA, II, o IIA, en

30

donde R_{1A} es C_1 - C_3 alquilo no sustituido. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula I, IA, II, o IIA, en donde R_{1A} se selecciona entre metilo, etilo, y propilo. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula I, IA, II, o IIA, en donde R_{1A} es etilo.

En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X se selecciona entre $C(O)OH$, $C(O)NH(CH_2)_mSO_3H$, y $C(O)NH(CH_2)_nCO_2H$. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X se selecciona entre $C(O)OH$, $C(O)NH(CH_2)SO_3H$, $C(O)NH(CH_2)CO_2H$, $C(O)NH(CH_2)_2SO_3H$, $C(O)NH(CH_2)_2CO_2H$. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X es $C(O)OH$. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X es OSO_3H . En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier sal. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X es OSO_3-Na^+ . En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde X es $OSO_3-NHET_3^+$. En un aspecto, el conjugado con aminoácido es un conjugado con glicina. En un aspecto, el conjugado con aminoácido es un conjugado con taurina.

En aún otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula II o IIA, en donde R_3 se selecciona entre OH , $NH(CH_2)SO_3H$, $NH(CH_2)CO_2H$, $NH(CH_2)_2SO_3H$, y $NH(CH_2)_2CO_2H$. En un aspecto, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula II o IIA, en donde R_3 es OH .

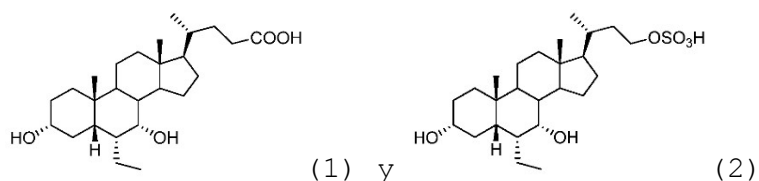
En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, I, o II, en donde R_4 es hidroxilo y R_7 es hidrógeno.

5 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula A, en donde R_1 , se selecciona entre metilo, etilo y propilo, R_4 es OH, R_7 es H, y R_2 es H.

En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula I o II, en donde R_{1A} se selecciona entre metilo, etilo y propilo, R_4 es OH, R_7 es H, y R_2 es H.

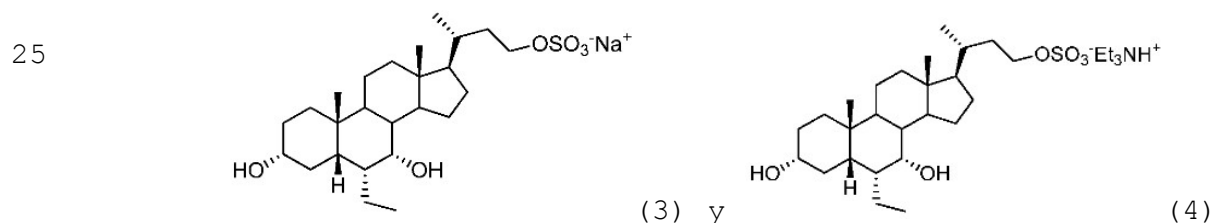
10 En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto de Fórmula IA o IIA, en donde R_{1A} se selecciona entre metilo, etilo y propilo, y R_2 es H.

En otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto que se selecciona de



20 o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En aún otro ejemplo, la composición incluye un primer compuesto que es una sal farmacéuticamente aceptable que se selecciona entre



Los compuestos de Fórmulas I, IA, II, y IIA son subconjuntos de los compuestos de Fórmula A. Las características descritas en la presente para los

compuestos de Fórmula A se aplican por igual a los compuestos de Fórmulas I, IA, II, y IIA. La presente solicitud también describe las composiciones farmacéuticas, envases o kits, y los usos terapéuticos de la combinación.

Uno de los problemas a resolver por la presente invención es la identificación de terapias combinadas para el tratamiento o prevención de afecciones relacionadas con concentraciones elevadas de compuestos lipídicos circulantes en la sangre, tales como colesterol y triglicéridos, por ejemplo, una afección colestásica de hígado tal como PBC, así como para la reducción de compuestos lipídicos circulantes (por ejemplo, colesterol, LDL, y triglicéridos) en la sangre, y para la reducción de bilirrubina y/o enzimas hepáticas, tales como fosfatasa alcalina (ALP, AP, o Alk Phos), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), y 5' nucleotidasa. A pesar de que existen fármacos disponibles para afecciones relacionadas con niveles de lípidos y/o niveles elevados de enzimas hepáticas, estos fármacos con frecuencia no son adecuados para muchos pacientes por diferentes razones. Por ejemplo, determinados fármacos no son eficaces para pacientes que han desarrollado resistencia al fármaco, por ejemplo, al ácido ursodesoxicólico. Como otro ejemplo, muchos fármacos estatinas tienen efectos adversos tales como problemas musculares, pérdida cognitiva, neuropatía, disfunción pancreática y hepática, y disfunción sexual. Algunos de los fármacos pueden ser no adecuados para el tratamiento cuando se administran solos. Por ejemplo, en algunas situaciones

un agente reductor de lípidos por sí solo no es adecuado para controlar el nivel severo de hiperlipidemia que se presenta en muchos pacientes. Algunos fármacos pueden requerir la administración de dosis altas, o una administración más frecuente, debido a un metabolismo alto a metabolitos inactivos o menos potentes. Las terapias combinadas que se describen en la presente pueden resolver los problemas mencionados precedentemente y pueden tener una o más ventajas, por ejemplo, de sinergismo, reducción del número de dosis diarias sin que el fármaco pierda eficacia, reducción de lípidos (colesterol y triglicéridos) en pacientes cuyos niveles elevados de lípidos son resistentes a terapia en PBC, potencia mejorada, selectividad, penetración en tejido, vida media, y/o estabilidad metabólica.

En las composiciones, envases o kits, métodos y usos de la presente invención, el primer compuesto puede ser el ácido libre o puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del conjugado con aminoácido (por ejemplo, conjugado con glicina o taurina). En un aspecto, el primer compuesto es cualquier agonista de FXR. En un aspecto, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A. En un aspecto, el primer compuesto es un compuesto de fórmula I o IA. En un aspecto, el primer compuesto es un compuesto de fórmula IA. En un aspecto, el primer compuesto es un compuesto de fórmula II o IIA. En un aspecto, el primer compuesto es un compuesto de fórmula IIA. En un aspecto, el primer compuesto es ácido obeticólico (Compuesto 1). En un aspecto, el primer compuesto es Compuesto 2. En un aspecto, el primer compuesto es la sal farmacéuticamente aceptable

Compuesto 3. En un aspecto, el primer compuesto es la sal farmacéuticamente aceptable Compuesto 4.

5 En las composiciones, envases o *kits*, métodos y usos de la presente invención, el fibrato puede ser cualquier fibrato. En un aspecto, el fibrato se selecciona del grupo que consiste en fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, etofibrato, gemfibrozil, nicofibrato, 10 pirifibrato, ronifibrato, simfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrada, y una sal y éster farmacéuticamente aceptables de los mismos, y derivados del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico en el cual el grupo fenoxilo está sustituido con un residuo sustituido 15 opcionalmente de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno o piperazina, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. EP0607536. En un aspecto, el fibrato se selecciona del grupo que consiste en bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, fenofibrato, 20 gemfibrozil, binifibrato, clinofibrato, ácido clofíbrico, nicofibrato, pirifibrato, plafibrada, ronifibrato, teofibrato, tocofibrato, y una sal y éster farmacéuticamente aceptables de los mismos, y derivados del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico, en el cual el grupo 25 fenoxilo está sustituido con un residuo sustituido opcionalmente de piperidina, 4-hidroxipiperidina, piperid-3-eno o piperazina, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. EP0607536. Un ejemplo del último grupo de sustancias es ácido 2-[3-[1-(4- 30 fluorobenzoyl)piperidin-4-il]fenoxi-2-metil-propanoico. Por ejemplo, el fibrato es bezafibrato, fenofibrato,

gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos. Por ejemplo, el fibrato es fenofibrato o una sal farmacéuticamente aceptable seleccionada de colina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, calcio, y trometamina. Por ejemplo, el fibrato es clofibrato o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos, tal como etofibrato o clofibrato de aluminio. Por ejemplo, el fibrato es bezafibrato. Por ejemplo, el fibrato es un derivado del ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico tal como ácido 2-[3-[1-(4-fluorobenzoil)-piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

En una forma de realización, el primer compuesto es el ácido libre de un compuesto de Fórmula A, y el por lo menos un fibrato se selecciona entre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, y una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma de realización, el primer compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de Fórmula A, y el por lo menos un fibrato se selecciona entre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, y una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma de realización, el primer compuesto es el conjugado con glicina de un compuesto de Fórmula A, y el por lo menos un fibrato se selecciona entre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, y una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma de realización, el primer compuesto es el conjugado con taurina de un compuesto de Fórmula A, y el

por lo menos un fibrato se selecciona entre bezafibrato, fenofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, clofibrato, y sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 En una forma de realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido, y el por lo menos un fibrato es ácido 2-[3-[1(4-fluorobenzoyl)-piperidin-4-il]fenoxil-2-metilpropanoico.

10 En una forma de realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido, y el por lo menos un agonista de PPAR-delta es ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il}metil)sulfanil]-2-metilfenoxi}acético, ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsilfanil]-fenoxi}-acético, o ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metilfenoxi]-acético, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 En una forma de realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido, y el por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico. En una forma de realización, el primer compuesto es un compuesto de fórmula A o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido, y el por lo menos un agonista dual de PPAR-alfa y gamma es aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar, o saroglitazar, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En un

25

30

ejemplo, el agonista dual de PPAR-alfa y delta es ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxil]-2-metilpropanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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

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

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

En una forma de realización, el primer compuesto es el conjugado con glicina de un compuesto de Fórmula A, y la por lo menos una estatina se selecciona entre simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina,

atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

5 En una forma de realización, el primer compuesto es el conjugado con taurina de un compuesto de Fórmula A, y la por lo menos una estatina se selecciona entre simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina.

10 La invención además comprende un primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, el cual tiene una estructura que es idéntica a la del primer compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA), excepto por el hecho que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico más comúnmente encontrado en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en el primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, flúor, tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C y ^{18}F .

25 El primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo que contiene los isótopos mencionados precedentemente y/u otros isótopos de otros átomos se encuentra dentro del alcance de la presente invención. El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o

30

conjugado con aminoácido del mismo, por ejemplo, un primer compuesto en el cual se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H y/o ^{14}C , es útil en ensayos de distribución de fármacos y/o sustrato en tejidos. Los isótopos tritio, es decir, ^3H , y carbono 14, es decir, ^{14}C , son útiles por su facilidad para prepararlos y detectarlos. Además, la sustitución con isótopos más pesados tal como deuterio, es decir, ^2H , puede brindar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media *in vivo* aumentada o menores requerimientos de dosificación y, por lo tanto, pueden usarse en algunas circunstancias. El primer compuesto marcado isotópicamente o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo en general puede prepararse mediante procedimientos descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos de la invención, por sustitución de un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. En una forma de realización, el ácido obeticólico, o sales farmacéuticamente aceptables o conjugados de aminoácido del mismo no están marcados isotópicamente.

La presente invención también provee un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita.

En una forma de realización, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección mediada por FXR. Los ejemplos de las enfermedades o afecciones mediadas por FXR incluyen,

a título enunciativo no taxativo, enfermedades hepáticas (que incluyen enfermedades hepáticas colestásicas y no colestásicas) tales como cirrosis biliar primaria (PBC),
5 colangitis esclerosante primaria (PSC), atresia biliar, hipertensión portal, diarrea por ácidos biliares, enfermedad hepática crónica, enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), infección con hepatitis C, enfermedad hepática alcohólica,
10 daño hepático debido a fibrosis progresiva, y fibrosis hepática. Los ejemplos de enfermedades mediadas por FXR también incluyen hiperlipidemia, LDL-colesterol alto, HDL-colesterol alto, triglicéridos altos, y enfermedad cardiovascular.

15 La NAFLD es una afección médica que se caracteriza por la acumulación de grasa (llamada infiltración grasa) en el hígado. La NAFLD es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica, y abarca un espectro de afecciones asociadas con la deposición de lípidos en los hepatocitos. Varía en un rango entre esteatosis (hígado
20 graso simple), hasta esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a fibrosis avanzada y cirrosis. La enfermedad es principalmente silente y con frecuencia se descubre por niveles incidentalmente elevados de enzimas hepáticas. La
25 NAFLD se encuentra muy asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina y actualmente es considerada por muchos como el componente hepático del síndrome metabólico.

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una afección que provoca inflamación y acumulación de grasa y
30 tejido fibroso (cicatriz) en el hígado. Los niveles de enzimas hepáticas en la sangre pueden ser más elevados que

las elevaciones leves vistas en el hígado graso no
alcohólico (NAFL). A pesar de que pueden aparecer
afecciones similares en la gente que abusa del alcohol, la
5 NASH se presenta en aquellas personas que toman de poco a
nada de alcohol. La NASH afecta a entre 2 y 5 por ciento de
los americanos, y se ve con mayor frecuencia en personas
con una o más de las siguientes condiciones: obesidad,
diabetes, hiperlipidemia, resistencia a insulina, usos de
10 determinadas medicaciones, y exposición a toxinas. La NASH
es una causa común en aumento de enfermedad hepática
crónica en el mundo y está asociada con mortalidad
aumentada relacionada con el hígado y carcinoma
hepatocelular, incluso en ausencia de cirrosis. La NASH
15 progresa a cirrosis en entre 15 y 20% de los individuos
afectados y ahora es una de las indicaciones principales
para el trasplante de hígado en los Estados Unidos. En la
actualidad no hay terapias aprobadas para la NASH.

En una forma de realización, la enfermedad o afección
20 es hiperlipidemia. En una forma de realización, la
enfermedad o afección es una enfermedad hepática
colestásica. En una forma de realización, la enfermedad o
afección es PBC. En otra forma de realización, la
enfermedad o afección es una enfermedad cardiovascular. En
25 otra forma de realización, la enfermedad cardiovascular es
aterosclerosis, hipercolesterolemia, o hipertrigliceridemia.

La presente invención también provee un método para
tratar o prevenir NAFLD o NASH. En una forma de realización,
la presente invención provee un método para tratar o
30 prevenir NAFLD o NASH que está asociada con hiperlipidemia.
En una forma de realización, la presente invención provee

un método para tratar o prevenir NASH. En una forma de realización, la presente invención provee un método para tratar o prevenir NASH que está asociada con hiperlipidemia.

5 La presente invención también provee un método para inhibir o revertir la fibrosis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita. En una forma de realización, el sujeto no padece de una afección colestásica. En otra forma de realización,
10 el sujeto padece de una afección colestásica.

En una forma de realización, el sujeto no padece de una afección colestásica asociada con una enfermedad o afección que se selecciona del grupo que consiste en cáncer hepático y biliar primario (que incluye carcinoma hepatocelular), cáncer colorrectal, cáncer metastásico, sepsis, nutrición parental total crónica, fibrosis quística, y enfermedad hepática granulomatosa. En formas de
15 realización, la fibrosis a ser inhibida o revertida se produce en un órgano en el cual se expresa FXR.

En una forma de realización, una afección colestásica se define como una que tiene un nivel elevado de manera anormal en suero de fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), y/o 5' nucleotidasa. En otra forma de
25 realización, una afección colestásica se define adicionalmente como que se presenta con al menos un síntoma clínico. En una forma de realización, el síntoma es picazón (prurito). En otra forma de realización, una afección colestásica se selecciona del grupo que consiste en cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante
30 primaria (PBS), colestasis inducida por fármacos,

colestasis hereditaria, atresia biliar, y colestasis intrahepática de embarazo.

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

10 En una forma de realización, el sujeto tiene fibrosis hepática asociada con una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B; hepatitis C; enfermedades hepáticas por parásitos; infecciones bacterianas, virales y fúngicas posteriores a trasplante; enfermedad hepática alcohólica (ALD); enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH); enfermedades hepáticas inducidas por metotrexato, isoniazid, oxifenistatina, metildopa, clorpromazina, tolbutamida, o amiodarona; hepatitis autoinmunitológica; sarcoidosis; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; enfermedad de Gaucher; enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipos III, IV, VI, IX y X; deficiencia de α_1 -antitripsina; síndrome de Zellweger; tirosinemia; fructosemia; galactosemia; desorden vascular asociado con síndrome de Budd-Chiari, enfermedad venooclusiva, o trombosis de vena portal; y fibrosis hepática congénita.

25 En otra forma de realización, el sujeto tiene fibrosis intestinal asociada con una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, colitis posterior a radiación, y colitis microscópica.

30 En otra forma de realización, el sujeto tiene fibrosis renal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía diabética, nefroesclerosis

hipertensiva, glomerulonefritis crónica, glomerulopatía por trasplante crónica, nefritis intersticial crónica, y enfermedad de riñón poliquístico.

5 La presente invención también provee un método para tratar o prevenir todas las formas de afecciones relacionadas con niveles elevados de lípidos. En una forma de realización, la afección es hiperlipidemia a la cual está asociada una afección seleccionada de cirrosis biliar
10 primaria resistente; cirrosis biliar primaria en la cual hay asociada una elevación en la prueba de la función hepática e hiperlipidemia, colangitis esclerosante primaria, esteatohepatitis no inducida por alcohol; y enfermedad hepática crónica asociada con hepatitis B, C o alcohol. En
15 otra forma de realización, la presente invención provee un método para tratar o prevenir hiperlipidemia en donde la hiperlipidemia es hiperlipidemia primaria con o sin un componente genético, o hiperlipidemia asociada con enfermedad de arterias coronarias, enfermedad
20 cerebrovascular arterial, enfermedad vascular periférica, aneurismas de aorta, o aterosclerosis carotídea.

 En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir colangitis esclerosante primaria para anormalidades bioquímicas similares, así como
25 hepatitis crónica provocada por hepatitis B, C o por alcohol. En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir otros trastornos arteriales asociados con hiperlipidemia. En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir
30 hipertrigliceridemia.

La presente invención también provee un método para reducir los niveles de lípidos (es decir, cantidad de lípidos), tal como los de la sangre, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de lípidos en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene niveles elevados de lípidos, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En una forma de realización, el método de la presente solicitud reduce los niveles de lípidos a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de lípidos en un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente).

En una forma de realización, el lípido es colesterol. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol en lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene niveles elevados de colesterol, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la

presente). En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol por debajo de 400 mg/L, 350 mg/L, 300 mg/L, 250 mg/L, 240 mg/L, 230 mg/L, 220 mg/L, 210 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, o 150 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de colesterol por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, o 150 mg/L.

En una forma de realización, el colesterol es LDL. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene niveles elevados de LDL, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L. En

una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 100 mg/L, 90 mg/L, 80 mg/L, 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de LDL por debajo de 70 mg/L, 60 mg/L, o 50 mg/L.

En una forma de realización, el lípido consiste en triglicéridos. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene niveles elevados de triglicéridos, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L, 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, o 100 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 200 mg/L, 190 mg/L, 180 mg/L, 170 mg/L, 160 mg/L, 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, o 100 mg/L. En una forma de realización, el método de la presente invención reduce los niveles de triglicéridos por debajo de 150 mg/L, 140 mg/L, 130 mg/L, 120 mg/L, 110 mg/L, o 100 mg/L.

La presente invención también provee un método para reducir la cantidad de bilirrubina, y/o uno o más enzimas hepáticas, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que lo necesita.

En una forma de realización, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de bilirrubina en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene un nivel elevado de bilirrubina, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En una forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina a un nivel normal (por ejemplo, similar al nivel de bilirrubina en un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina por debajo de 10 mg/L, 9 mg/L, 8 mg/L, 7 mg/L, 6 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L, 1.5 mg/L, 1.2 mg/L, o 1 mg/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de bilirrubina por debajo de 2 mg/L, 1.5 mg/L, 1.2 mg/L, o 1 mg/L.

En una forma de realización, la enzima hepática se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina (ALP, AP, o Alk Phos), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl

transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), y 5' nucleotidasa. En una forma de realización, el método de la presente solicitud reduce la cantidad de una o más enzimas hepáticas en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, en comparación con un sujeto control (por ejemplo, un sujeto no administrado con la composición de la presente invención). En una forma de realización, el sujeto tiene niveles elevados de una o más enzimas hepáticas, en comparación con un sujeto sano (por ejemplo, un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente). En una forma de realización, el método de la presente solicitud reduce los niveles de una o más enzimas hepáticas (por ejemplo, ALP, ALT, AST, GGT, LDH, y 5' nucleotidasa) a niveles normales (por ejemplo, similares a los niveles de enzimas hepáticas en un individuo no afectado por una enfermedad o afección, tales como aquellas que se describen en la presente).

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALP por debajo de 500 IU/L (unidades internacionales por litro), 400 IU/L, 300 IU/L, 200 IU/L, 180 IU/L, 160 IU/L, o 150 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALP a entre aproximadamente 40 IU/L y aproximadamente 150 IU/L.

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALT por debajo de 200 IU/L (unidades internacionales por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 80 IU/L, 60 IU/L, o 50 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de ALT a entre aproximadamente 5 IU/L y aproximadamente 50 IU/L.

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de AST por debajo de 200 IU/L (unidades internacionales por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 80 IU/L, 60 IU/L, 50 IU/L, o 40 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de AST a entre aproximadamente 10 IU/L y aproximadamente 50 IU/L.

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de GGT por debajo de 200 IU/L (unidades internacionales por litro), 150 IU/L, 100 IU/L, 90 IU/L, 80 IU/L, 70 IU/L, o 60 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de GGT a entre aproximadamente 15 IU/L y aproximadamente 50 IU/L o entre aproximadamente 5 IU/L y aproximadamente 30 IU/L.

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de LDH por debajo de 500 IU/L (unidades internacionales por litro), 400 IU/L, 300 IU/L, 200 IU/L, 180 IU/L, 160 IU/L, 150 IU/L, 140 IU/L, o 130 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de LDH a entre aproximadamente 120 IU/L y aproximadamente 220 IU/L.

En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de 5' nucleotidasa por debajo de 50 IU/L (unidades internacionales 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, o 5 IU/L. En otra forma de realización, el método de la presente solicitud reduce el nivel de 5' nucleotidasa a entre aproximadamente 2 IU/L y aproximadamente 15 IU/L.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra forma de realización, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, en donde el primer compuesto es un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4) o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con por lo menos un fibrato, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra forma de realización, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con por lo menos un fibrato, en donde el primer compuesto es un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4) o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con por lo menos una estatina, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra forma de realización, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con por lo menos una estatina, en donde el primer compuesto es un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4) o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, por lo menos una estatina, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra forma de realización, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, y/o agonista dual de PPAR-alfa y delta, por lo menos una estatina, en donde el primer compuesto es un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4) o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto que es un agonista de FXR, en combinación con por lo menos un fibrato, por lo menos una estatina, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra forma de realización, el método comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un primer compuesto, en combinación con por lo menos un fibrato, por lo menos una estatina, en donde el primer compuesto es un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4) o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo.

En una forma de realización, el sujeto es un mamífero. En una forma de realización, el mamífero es humano.

En una forma de realización, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, el o los fibratos, o la o las estatinas se administran en una combinación de dos maneras, es decir, sin ningún agente terapéutico diferente del primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, el o los fibratos, o la o las estatinas. En otra forma de realización, el primer compuesto y el o los fibratos se administran en una combinación de dos maneras, es decir, sin ningún agente terapéutico diferente del primer compuesto y el o los

fibratos. En otra forma de realización, el primer compuesto y la o las estatinas se administran en una combinación de dos maneras, es decir, sin ningún agente terapéutico diferente del primer compuesto y la o las estatinas.

En otra forma de realización, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran en una combinación de tres maneras con una estatina. En otra forma de realización, el primer compuesto y el o los fibratos se administran en una combinación de tres maneras con una estatina.

El primer compuesto, junto con el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, PPAR-alfa y delta o el o los agonistas duales de PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas pueden producir efectos sinérgicos profundos, tales como reducciones sinérgicas en estados hiperlipidémicos severos, combinados, y aquellos resistentes a terapias individuales y en los niveles de una o más enzimas hepáticas. Por lo tanto, para las hiperlipidemias muy difíciles de controlar, es ventajosa una combinación del primer compuesto, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o un fibrato, y/o una estatina. Puede resultar particularmente ventajoso para dicha combinación del primer compuesto, un fibrato, y/o una estatina que se provea en una composición farmacéutica individual con un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como en una forma de cápsula individual) diseñada para aumentar la aceptabilidad y por lo tanto la eficacia. En

consecuencia, la invención además provee una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del primer compuesto, una cantidad eficaz de por lo menos un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, o agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, y una cantidad eficaz de por lo menos una estatina, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, adyuvantes o excipientes. En una forma de realización, la invención además provee una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del primer compuesto, una cantidad eficaz de por lo menos un fibrato, y una cantidad eficaz de por lo menos una estatina, junto con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una forma de realización, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran de manera concurrente. Por ejemplo, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran juntos en una composición farmacéutica individual con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran secuencialmente. Por ejemplo, el primer compuesto se administra antes o después del o los agonistas de PPAR-alfa, del o los agonistas de

PPAR-delta, del o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o del o los fibratos.

5 En una forma de realización, el primer compuesto y la estatina se administran de manera concurrente. Por ejemplo, el primer compuesto y la estatina se administran juntos en una composición farmacéutica individual con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, el primer compuesto y la estatina se administran
10 secuencialmente. Por ejemplo, el primer compuesto se administra antes o después de la estatina.

En una forma de realización, el primer compuesto se administra en una primera dosis durante un primer periodo de tiempo, seguido por la administración del primer
15 compuesto en una segunda dosis durante un segundo periodo de tiempo. En una forma de realización, un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo se administra en una cantidad total diaria de entre 0.1 y 1500 mg, entre 0.2 y 1200 mg, entre
20 0.3 y 1000 mg, entre 0.4 y 800 mg, entre 0.5 y 600 mg, entre 0.6 y 500 mg, entre 0.7 y 400 mg, entre 0.8 y 300 mg, entre 1 y 200 mg, entre 1 y 100 mg, entre 1 y 50 mg, entre 1 y 30 mg, entre 4 y 26 mg, o entre 5 y 25 mg durante un primer periodo de tiempo, seguido por la administración del
25 primer compuesto en una cantidad total diaria entre 0.1 y 1500 mg, entre 0.2 y 1200 mg, entre 0.3 y 1000 mg, entre 0.4 y 800 mg, entre 0.5 y 600 mg, entre 0.6 y 500 mg, entre 0.7 y 400 mg, entre 0.8 y 300 mg, entre 1 y 200 mg, entre 1 y 100 mg, entre 1 y 50 mg, entre 1 y 30 mg, entre 4 y 26 mg,
30 o entre 5 y 25 mg. En una forma de realización, la cantidad total se administra oralmente una vez por día. En una forma

de realización, la primera dosis es diferente de la segunda dosis. En otra forma de realización, la primera dosis es menor que la segunda dosis. En otra forma de realización, la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En una forma de realización, la primera dosis es aproximadamente 5 mg (por ejemplo, entre 4.8 mg y 5.2 mg), y la segunda dosis es aproximadamente 10 mg (por ejemplo, entre 9.8 mg y 10.2 mg). En una forma de realización, el primer periodo de tiempo es aproximadamente 6 meses. En una forma de realización, el segundo periodo de tiempo es aproximadamente 6 meses.

En una forma de realización, la composición farmacéutica se administra oralmente, parenteralmente, o tópicamente. En otra forma de realización, la composición farmacéutica se administra oralmente.

Una composición de acuerdo con la presente invención típicamente contendrá suficiente primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo, uno o más agonistas de PPAR-alfa, uno o más agonistas de PPAR-delta, uno o más agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o uno o más fibratos, y/o una o más estatinas para permitir que la dosis diaria deseada de cada uno se administre a un sujeto que lo necesita en una forma de dosificación unitaria individual, tal como un comprimido o cápsula, o en dos o más formas de dosificación unitarias a administrar simultáneamente o con intervalos durante el día.

La invención también provee una composición farmacéutica en donde el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta,

el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran en combinación con UDCA. En un aspecto, UDCA se administra en una combinación de tres maneras. En otro aspecto, la combinación de dos maneras de un primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administra para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección, en lugar de UDCA a un sujeto el cual tiene una respuesta terapéutica inadecuada a UDCA solo.

En los métodos de la presente invención las sustancias activas se pueden administrar en dosis diarias individuales, o en dos, tres, cuatro o más dosis idénticas o divididas diferentes por día, y las mismas se pueden administrar simultáneamente o a tiempos diferentes durante el día. Usualmente, las sustancias activas se administrarán simultáneamente, más usualmente en una forma de dosificación combinada individual.

En un aspecto, el primer compuesto, el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, PPAR-alfa y delta o el o los agonistas duales de PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas se administran en dosificaciones sustancialmente iguales que las dosificaciones en que los mismos se administran en sus monoterapias respectivas. En un aspecto, el primer compuesto se administra en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%, menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) su dosificación como

monoterapia. En un aspecto, el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, PPAR-alfa y delta o el o los agonistas duales de PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%, menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) su dosificación como monoterapia. En un aspecto, el primer compuesto y el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos se administran en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%, menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) sus respectivas dosificaciones como monoterapia. En un aspecto, la o las estatinas se administra en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%, menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) su dosificación como monoterapia. En un aspecto, el primer compuesto y la o las estatinas se administran en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%, menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) sus dosificaciones como monoterapia respectivas. En un aspecto, el primer compuesto, el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas se administran en una dosificación que es menor que (por ejemplo, menor que 90%,

menor que 80%, menor que 70%, menor que 60%, menor que 50%, menor que 40%, menor que 30%, menor que 20%, o menor que 10%) sus respectivas dosificaciones como monoterapia.

5 Una composición farmacéutica de la presente invención puede estar en cualquier forma conveniente para la administración oral, tal como un comprimido, cápsula, polvo, gragea, píldora, caramelo, elixir, polvo liofilizado, solución, granulado, suspensión, emulsión, jarabe o tintura. También pueden prepararse formas de liberación lenta, de liberación modificada, o de liberación retrasada, por ejemplo en la forma de partículas recubiertas, comprimidos multicapa, cápsulas en cápsulas, comprimidos en cápsulas, o microgranulados.

15 Las formas sólidas para la administración oral pueden contener aglutinantes, endulzantes, agentes desintegrantes, diluyentes, agentes saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes para retraso del tiempo farmacéuticamente aceptables. Los aglutinantes adecuados incluyen goma acacia, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa o polietilenglicol. Los endulzantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartame o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato de dicalcio. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados

20
25
30

incluyen polímeros o copolímeros o ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, Zein, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes de retraso del tiempo adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

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

Las suspensiones para la administración oral pueden incluir adicionalmente agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato de sodio o alcohol cetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos tales como ácido esteárico, polioxietilen sorbitol mono o dioleato, estearato o laurato, polioxietilen sorbitano mono o dioleato, estearato o laurato y similares.

Las emulsiones para la administración oral además pueden incluir uno o más agentes emulsificantes. Los agentes emulsificantes adecuados incluyen agentes dispersantes tal como aquellos ejemplificados precedentemente o gomas naturales tales como goma acacia o goma tragacanto.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse por combinación, molienda, homogenización, suspensión, disolución, emulsificación, dispersado y/o mezclado del primer compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido y por lo menos un agente reductor de lípidos, por ejemplo, fibrato, y opcionalmente la o las estatinas junto con uno o más excipientes, uno o más vehículos, uno o más adyuvantes y/o uno o más diluyentes seleccionados. Un tipo de composición farmacéutica de la presente invención en la forma de un comprimido o cápsula puede prepararse por (a) preparación de un primer comprimido que comprende por lo menos una de las sustancias activas seleccionadas del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo y por lo menos un agente reductor de lípidos junto con uno o más excipientes, uno o más vehículos, uno o más adyuvantes y/o uno o más diluyentes deseados, y (b) preparación de un segundo comprimido o una cápsula, en donde el segundo comprimido o la cápsula incluye la o las sustancias activas remanentes y el primer comprimido. Otro tipo de composición farmacéutica de la presente invención en la forma de una cápsula puede prepararse por (a) preparación de una primera cápsula que comprende por lo menos una de las sustancias activas

seleccionadas del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo y el o los agentes reductores de lípidos, junto con cualquiera de uno o más excipientes, vehículos, adyuvantes y/o diluyentes deseados, y (b) preparación de una segunda cápsula, en donde la segunda cápsula incluye la o las sustancias activas remanentes y la primera cápsula. Otro tipo de composición farmacéutica de la presente invención en la forma de un comprimido puede prepararse por (a) preparación de una cápsula que comprende por lo menos una de las sustancias activas seleccionadas de un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo y por lo menos un agente reductor de lípidos, junto con cualquiera de uno o más excipientes, vehículos, adyuvantes y/o diluyentes deseados, y (b) preparación de un comprimido, en donde el comprimido incluye la o las sustancias activas remanentes y la cápsula.

En formas de realización, el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas se usan como un comprimido de liberación inmediata o como un comprimido de liberación sostenida. Cuando se provee en un comprimido de liberación sostenida resulta particularmente eficaz. Los comprimidos de liberación sostenida de diferentes agentes reductores de lípidos se encuentran disponibles comercialmente. Se prefiere para una acción prolongada que el comprimido tenga un formato de liberación sostenida.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende una cápsula

que contiene el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas en una cápsula que contiene un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo. Típicamente en esta forma el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas están presentes en una forma de liberación inmediata. En ese caso es común administrar la composición tres veces por día. Otro modo de administración es proveer una composición que contiene el o los agonistas de PPAR-alfa, el o los agonistas de PPAR-delta, el o los agonistas duales de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o el o los fibratos, y/o la o las estatinas en una forma de liberación sostenida o de liberación no sostenida como se describió precedentemente, dos veces por día, en donde la cantidad diaria de la composición administrada contiene una cantidad suficiente de las sustancias activas para proveer la dosificación diaria deseada al paciente.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención están en una forma de dosificación que comprende un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo en una cantidad total diaria de entre 0.1 y 1500 mg, entre 0.2 y 1200 mg, entre 0.3 y 1000 mg, entre 0.4 y 800 mg, entre 0.5 y 600 mg, entre 0.6 y 500 mg, entre 0.7 y 400 mg, entre 0.8 y 300 mg, entre 1 y 200 mg, entre 1 y 100 mg, entre 1 y 50 mg, entre 1 y 30 mg, entre 4 y 26 mg, o entre

5 y 25 mg. En una forma de realización, la cantidad total se administra oralmente una vez por día.

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

En formas de realización, las composiciones de la invención están en una forma de dosificación que comprende
20 un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato, y/o estatina en una cantidad entre 10 y 1000 mg, entre 20 y 800 mg, entre 50 y 500 mg, entre 80 y 400 mg, o entre 100 y 300 mg, más típicamente aproximadamente 200 mg, contenida
25 en una cápsula que contiene el primer compuesto en una cantidad de entre 0.1 y 1500 mg, entre 0.2 y 1200 mg, entre 0.3 y 1000 mg, entre 0.4 y 800 mg, entre 0.5 y 600 mg, entre 0.6 y 500 mg, entre 0.7 y 400 mg, entre 0.8 y 300 mg, entre 1 y 200 mg, entre 1 y 100 mg, entre 1 y 50 mg, entre
30 1 y 30 mg, entre 4 y 26 mg, o entre 5 y 25 mg. En una forma de realización, el agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-

delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato, y/o estatina está en la forma de liberación sostenida.

5 En formas de realización, las composiciones de la invención están en una forma de dosificación que comprende un comprimido de liberación sostenida de bezafibrato, en una cantidad entre 10 y 1000 mg, entre 20 y 800 mg, entre 50 y 500 mg, entre 80 y 400 mg, entre 100 y 300 mg, más típicamente aproximadamente 200 mg, contenida en una
10 cápsula que contiene el primer compuesto en una cantidad de entre 0.1 y 1500 mg, entre 0.2 y 1200 mg, entre 0.3 y 1000 mg, entre 0.4 y 800 mg, entre 0.5 y 600 mg, entre 0.6 y 500 mg, entre 0.7 y 400 mg, entre 0.8 y 300 mg, entre 1 y 200
15 mg, entre 1 y 100 mg, entre 1 y 50 mg, entre 1 y 30 mg, entre 4 y 26 mg, o entre 5 y 25 mg. En este sentido el paciente al cual se le administra la forma de dosificación recibe un comprimido de liberación sostenida de bezafibrato que se administra en el antro distal a medida que se rompe la cápsula y libera el primer compuesto.
20

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse de por vida por el paciente, prolongando la supervivencia y retrasando el trasplante hepático. La reducción de la hiperlipidemia y de las enzimas hepáticas
25 asegura una reducción en el desarrollo de enfermedad vascular asociada. El primer compuesto así como los agentes reductores de lípidos, tales como fibratos y/o estatinas tienen un perfil de efectos secundarios a largo plazo mínimo (con algunas excepciones para bezafibrato) y por lo
30 tanto esta combinación probablemente es la terapia de elección para la cirrosis biliar primaria (PBC) con

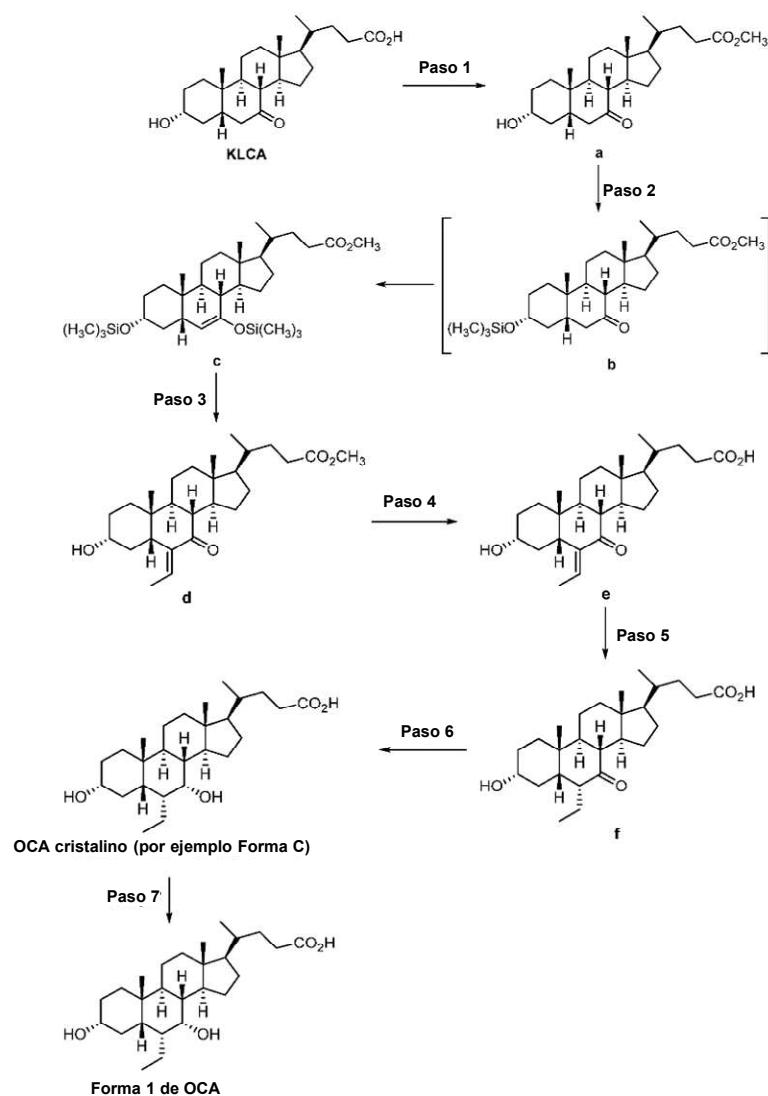
hiperlipidemia y para la cirrosis biliar primaria resistente (PBC). Debido a la dosificación simplificada provista por la presente invención, puede usarse una
5 terapia combinada de la presente invención en dosis crecientes, dependiendo del peso y de la respuesta clínica del paciente.

Puede proveerse una composición de la presente invención que comprende un primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del
10 mismo, un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato, y/o una estatina como las tres sustancias activas en una cápsula individual. En una forma de dicha composición, puede mezclarse una estatina con un primer
15 compuesto en una cápsula interna, en donde la cápsula interna está rodeada por un agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato contenido en una cápsula externa. Las posiciones dentro de las cápsulas pueden invertirse. Es
20 decir, la mezcla de una estatina y un primer compuesto puede estar contenida en la cápsula externa y el agonista de PPAR-alfa, agonista de PPAR-delta, agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma, o fibrato pueden estar contenidos en la cápsula interna. Esta disposición
25 será especialmente deseada si la cantidad de la estatina a administrar es relativamente grande. Para la administración de la combinación de tres sustancias activas hay otras combinaciones posibles.

30 Los primeros compuestos descritos en la presente pueden prepararse mediante métodos convencionales (por

ejemplo, aquellos que se describen en la Publicación de los EE.UU. No. 2009/0062526, Patente de los EE.UU No. 7,138,390, y WO 2006/122977), tal como mediante una síntesis en 6 pasos seguidos por un paso de purificación para producir un Compuesto 1 muy puro (ácido obeticólico, u OCA) como se muestra en el Esquema 1 siguiente.

Esquema 1



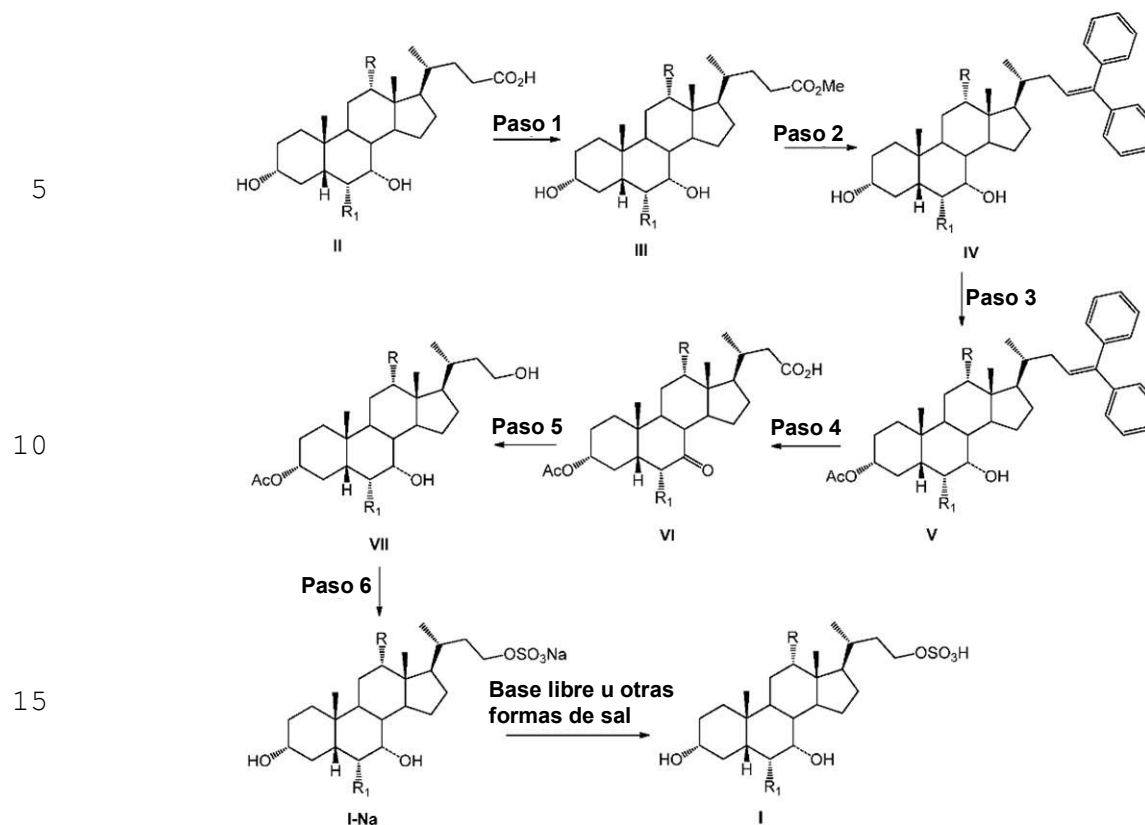
El proceso precedente se describió en WO 2013/192097, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de

referencia en su totalidad. El proceso es una síntesis en 6
pasos seguidos por un paso de purificación. El paso 1 es la
esterificación del ácido carboxílico del C-24 del ácido 7-
cetolítico (KLCA) para producir el éster de metilo
5 compuesto a. El paso 2 es la formación de sililenol éter
del compuesto 1 para producir el compuesto c. El paso 3 es
una reacción de condensación de aldol del sililenol éter
compuesto c y acetaldehído para producir el compuesto d. El
10 paso 4 es la saponificación del compuesto d para producir
el compuesto e. El paso 5 es la hidrogenación del compuesto
e para producir el compuesto f. El paso 6 es la reducción
selectiva del grupo 7-ceto del compuesto f para producir el
Compuesto 1 cristalino. El paso 7 es la conversión del
15 compuesto cristalino al Compuesto 1 amorfo (Forma 1 del
ácido obético, o Forma 1 de OCA).

Como alternativa, el primer compuesto descrito en la
presente puede prepararse mediante los métodos
convencionales (por ejemplo, aquellos descritos en la
20 Patente de los EE.UU. No. 7,932,244), o mediante un proceso
que se muestra en el Esquema 2 (y se describe en WO
2014/066819). El esquema 2 puede usarse para preparar el
Compuesto 2, 3 o 4 descrito en la presente.

25

30



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

Definiciones

Por conveniencia, se describen a continuación determinados términos usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones anexas.

Como se usa en la presente el término "fibrato" se refiere a cualquier derivado de ácido fíbrico y derivados farmacéuticamente activos de ácido 2-fenoxi-2-metilpropanoico útiles en los métodos descritos en la presente. Los ejemplos de fibratos incluyen, a título enunciativo no taxativo, fenofibrato, bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, etofibrato, gemfibrozil, nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato, teofibrato, tocofibrato, plafibrida, etc. Los ejemplos de fibratos también se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 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 y 7,259,186; Publicación de los EE.UU. No. 20090131395; WO2008/039829; Patente Belga no. 884722; Patente del Reino Unido no. 860303; y Publicación de Solicitud de Patente Europea no. EP0607536, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia.

El receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR-alfa), también conocido como NR1C1 (subfamilia 1 del receptor nuclear, grupo C, miembro 1), es una proteína receptora nuclear. Un agonista de PPAR-alfa se une y activa a PPAR-alfa. Los ejemplos de un agonista de PPAR-alfa incluyen, a título enunciativo no taxativo, un fibrato, tales como los fibratos descritos en la presente.

El receptor delta activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR-delta), también conocido como NR1C2 (subfamilia 1 del receptor nuclear, grupo C, miembro 2), es una proteína receptora nuclear. Un agonista de PPAR-delta se une y activa a PPAR-delta. Los ejemplos de un agonista de PPAR-delta incluyen, a título enunciativo no taxativo, ácido {4-[(4-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il)metil)sulfanil]2-metilfenoxi}acético (también conocido en el arte como GW501516, GW1516, y Endurabol), ácido {2-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsulfanil]fenoxi}-acético, y ácido [4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil]metil]tio]-2-metilfenoxi]-acético.

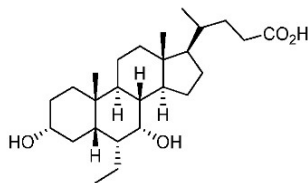
Un agonista dual de PPAR-alfa y delta o PPAR-alfa y gamma se une y activa a PPAR-alfa y PPAR-delta, o a PPAR-alfa y PPAR-gamma. Los ejemplos de agonistas duales de PPAR-alfa y delta incluyen, a título enunciativo no taxativo, ácido 2-[2,6 dimetil-4-[3-[4(metiltio)fenil]-3-oxo-1(E)-propenil]fenoxi]-2-metilpropanoico (también conocido como GFT505). Los ejemplos de agonistas duales de PPAR-alfa y gamma incluyen, a título enunciativo no taxativo, 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]bencil}glicina, CAS No. 331741-94-7), tesaglitazar ácido ((2S)-2-etoxi-3-[4-[2-(4-metilsulfoniloxifenil)etoxi]fenil]propanoico, CAS No. 251565-85-2) y saroglitazar ácido ((2S)-2-etoxi-3-[4-(2-{2-

metil-5-[4-(metilsulfanil)fenil]-1H-pirrol-1-il}etoxi)fenil]propanoico, CAS No. 495399-09-2).

5 Como se usa en la presente, el término "agonista de FXR" se refiere a cualquier compuesto que activa a FXR. En un aspecto, un agonista de FXR alcanza por lo menos una activación de 50% de FXR en relación a CDCA, el control positivo apropiado en los métodos de ensayo descritos en WO 2000/037077. En otro aspecto, un agonista de FXR alcanza una activación del 100% de FXR en el ensayo de proximidad de centelleo o en el ensayo de HTRF como se describe en W02000/037077. Los ejemplos de agonistas de FXR incluyen a título enunciativo no taxativo aquellos descritos en U.S. 7,138,390; 7,932,244; 20120283234; 20120232116; 20120053163; 20110105475; 20100210660; 20100184809; 20100172870; 15 20100152166; 20100069367; 20100063018; 20100022498; 20090270460; 20090215748; 20090163474; 20090093524; 20080300235; 20080299118; 20080182832; 20080039435; 20070142340; 20060069070; 20050080064; 20040176426; 20030130296; 20030109467; 20030003520; 20020132223; y 20 20020120137.

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

25

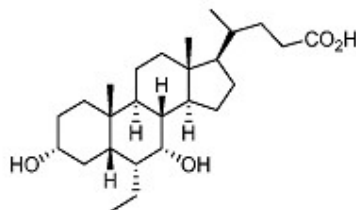


30

El ácido obeticólico también referido como Forma 1 del ácido obeticólico, INT-747, ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-6- α -etil-5 β -colan-24-oico, ácido 6 α -etil-quenodesoxicólico, 6-etil-

CDCA, 6ECDCA, ácido colan-24-oico, 6-etil-3,7-dihidroxi-(3 α ,5 β ,6 α ,7 α), y puede prepararse mediante los métodos descritos en la Publicación de los EE.UU. No. 2009/0062526 A1, Patente de los EE.UU. No. 7,138,390, y WO2006/122977. El número de registro CAS para ácido obeticólico es 459789-99-2.

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



El ácido obeticólico cristalino se refiere a que el compuesto está cristalizado en una disposición de empaquetamiento cristalino específico en tres dimensiones espaciales o que el compuesto tiene planos de caras externas. La forma cristalina del ácido obeticólico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino, las cuales tienen todas la misma composición elemental del ácido obeticólico. Las diferentes formas cristalinas usualmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectro infrarrojo, puntos de fusión, densidad, dureza, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El solvente de recristalización, tasa de cristalización, temperatura de almacenamiento, y otros factores pueden hacer que domine una forma cristalina. Los cristales de

ácido obeticólico pueden prepararse por cristalización en diferentes condiciones, por ejemplo, diferentes solventes, temperaturas, etc. Los ejemplos de formas cristalinas de OCA se describen en la Patente de los EE.UU. No. 9,238,673.

El término "primer compuesto" se refiere a un compuesto de Fórmula A, I, IA, II, o IIA, o Compuesto 1, 2, 3, o 4, o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo. Cada vez que se usa el término en el contexto de la presente invención se comprende que se hace referencia a la base libre, un compuesto marcado isotópicamente, un compuesto cristalino, o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugados con aminoácido correspondiente del mismo, con la condición que sea posible y/o apropiado en las circunstancias.

Como se usa en la presente, el término "conjugados con aminoácido" se refiere a conjugados de un primer compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula A) con cualquier aminoácido adecuado. Por ejemplo, dicho conjugado con aminoácido adecuado de un compuesto de Fórmula A tendrá la ventaja adicional de integridad mejorada en bilis o fluidos intestinales. Los aminoácidos adecuados incluyen a título enunciativo no taxativo glicina y taurina. Por lo tanto, la presente invención abarca los conjugados con glicina y taurina de un primer compuesto de la presente invención (por ejemplo, Compuesto 1).

El término "estatina" es sinónimo de los términos "inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa" e "inhibidor de HMG-CoA reductasa". Estos términos se usan como sinónimos en la presente. Tal como lo sugiere el sinónimo, las estatinas son inhibidores de 3-

hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa y, como tales, son eficaces para reducir el nivel de colesterol de plasma sanguíneo y en consecuencia para tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares. Las estatinas y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas son particularmente útiles para reducir los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en mamíferos y particularmente en humanos. Estructuralmente, las estatinas o derivados de las mismas tienen en común un sistema 4-hidroxi-6-oxo-2H-pirano, que también puede estar en la forma de dihidroxiácido que interacciona con el sitio activo de HMG-CoA reductasa, y una parte lipofílica que se presenta en particular como un sistema hexahidronaftalénico polisustituido, para también puede estar reemplazado con un sistema heteroaromático polisustituido, como en atorvastatina o fluvastatina. La estatina adecuada para usar en la presente incluye, a título enunciativo no taxativo, simvastatina, fluvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, atorvastatina, cerivastatina, lovastatina, pitavastatina, fluindostatina, velostatina, dalvastatina, rosuvastatina, dihidrocompactina y compactina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El término "agente reductor de lípidos" se refiere a cualquier agente que tiene la capacidad de reducir la concentración de lípidos (por ejemplo, colesterol, LDL, y triglicérido) en circulación (por ejemplo, en la sangre). Un agente reductor de lípidos incluye, a título enunciativo no taxativo, (i) un secuestrante de ácidos biliares, tal como una resina (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesevelam), (ii) un inhibidor de absorción de colesterol,

que previene la incorporación de colesterol (por ejemplo, del intestino delgado al sistema circulatorio), tal como ezetimibe (es decir, (3R,4S)-1-(4-fluorofenil)-3-[(3S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroxipropil]-4-(4hidroxifenil)azetidin-2-ona) y (3R,4S)-1,4-bis(4-metoxifenil)-3-(3-fenilpropil)-2-azetidinona, (iii) ésteres de ácidos grasos omega-3, que incluye derivados de ácidos grasos libres (por ejemplo, Omacor®, Lovaza®, Vascepa™, Epadel, Epanova™), o ácidos grasos polinsaturados omega-3 (PUFA) de origen marino, (iv) inhibidores de PCSK9, (v) ácido nicotínico, (vi) fitoesteros (por ejemplo, esteroides y estanoles vegetales), tales como β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, ergosterol, β -sitostanol, campestanol, estigmastanol, cicloartenol, y lupeol, (vii) inhibidores de CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterol), tales como Anacetrapib, Evacetrapib, Torcetrapib, y Dalcetrapib, (viii) inhibidores de escualeno sintasa, (ix) oligonucleótidos antisentido que afectan la síntesis, degradación, absorción, y metabolismo de lípidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que se unen al ARNm que codifica para la apolipoproteína B o PCSK9) (por ejemplo, Mipomersen (Kynamro)), (x) inhibidores de apoproteína-B, (xi) inhibidores de la proteína microsomal de transporte de triglicéridos (por ejemplo, Lomitapide (Juxtapid)), y (xii) otros compuestos, tales como colesevelam, avasimibe, e implitapide.

"Tratar", incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular, o eliminar, que genera una mejora en la afección, enfermedad, trastorno, etc. "Tratar" o "tratamiento" de un estado de enfermedad incluye: inhibir

el estado de la enfermedad, es decir, detener el desarrollo del estado de la enfermedad o sus síntomas clínicos, o aliviar el estado de la enfermedad, es decir, provocar la
5 regresión temporal o permanente del estado de enfermedad o sus síntomas clínicos.

"Prevenir" el estado de la enfermedad incluye hacer que los síntomas clínicos del estado de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto o
10 predispuesto al estado de la enfermedad, pero que no experimenta o presenta síntomas del estado de la enfermedad.

El término "inhibir" o "inhibición", tal como se usa en la presente documentación, se refiere a cualquier efecto positivo detectable en el desarrollo o progresión de una
15 enfermedad o afección. Dicho efecto positivo puede incluir el retraso o el impedimento del inicio de por lo menos un síntoma o signo de la enfermedad o afección, el alivio o la reversión del o los síntomas o signos, y el enlentecimiento o la prevención de un empeoramiento adicional del o de los
20 síntomas o signos.

El término "estado patológico" designa a cualquier enfermedad, trastorno, afección, síntoma, o indicación.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en la presente documentación se refiere a una cantidad de un primer
25 compuesto (por ejemplo, un ligando activador de FXR), o un fibrato, o un agente reductor de lípidos, o una estatina que produce un efecto terapéutico agudo o crónico ante la administración de una dosis apropiada, solos o en forma combinada. En una forma de realización, una cantidad eficaz
30 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer

compuesto (por ejemplo, un ligando activador de FXR) produce un efecto terapéutico agudo o crónico ante la administración de una dosis apropiada en combinación con por lo menos un fibrato. El efecto incluye la prevención, corrección, inhibición, o reversión de los síntomas, signos y patología subyacente de una enfermedad/afección (por ejemplo, fibrosis del hígado, riñón, o intestino) y de las complicaciones relacionadas e cualquier extensión detectable. Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" variarán dependiendo del primer compuesto, el fibrato, el agente reductor de lípidos, la estatina, la enfermedad y su severidad, y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer compuesto puede formularse junto con uno o más fibratos, y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración a un humano o a un animal no humano. En consecuencia, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse, por ejemplo, por la ruta oral, parenteral, o tópica, para proveer una cantidad eficaz del primer compuesto y el o los fibratos. En formas de realización alternativas, las composiciones de la invención pueden usarse para recubrir o impregnar un dispositivo médico, por ejemplo, un dispositivo intraluminal.

"Efecto farmacológico" tal como se usa en la presente documentación abarca efectos producidos en el sujeto que logran el propósito pretendido de una terapia. En una forma de realización, un efecto farmacológico se refiere a que las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando

se previenen, alivian, o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico podría ser uno que da como resultado la prevención, alivio o reducción de las indicaciones primarias en un sujeto tratado. En otra forma de realización, efecto farmacológico se refiere que los trastornos o síntomas de las indicaciones primarias del sujeto que se está tratando se previenen, alivian, o reducen. Por ejemplo, un efecto farmacológico podría ser uno que da como resultado la prevención, alivio o reducción de los trastornos o síntomas en un sujeto tratado.

Se comprende que los isómeros que surgen de los átomos de carbono asimétricos (por ejemplo, todos los enantiómeros y diastereoisómeros) están incluidos dentro del alcance de la invención, a menos que se indique de otra manera. Dichos isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y por síntesis controlada estereoquímicamente.

Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene agentes terapéuticos tales como un primer compuesto y un agente reductor de lípidos, tal como un fibrato, en una forma adecuada para la administración a un sujeto. En una forma de realización, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación en bruto o unitaria. La formulación de las composiciones en una forma unitaria de dosificación puede resultar ventajoso para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de

reactivo activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas unitarias de dosificación de la invención están
5 impuestas por, y dependen directamente, de las características únicas de los agentes activos y del efecto terapéutico particular a obtener, y las limitaciones inherentes en el arte de la fabricación de compuestos tal como un agente activo para el tratamiento de individuos.

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

La forma de dosificación unitaria es una cualquiera de una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una bomba individual
20 en un inhalador en aerosol, o un vial. La cantidad del primer compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o conjugado con aminoácido del mismo en una dosis unitaria de la composición es una cantidad eficaz y varía de acuerdo con el tratamiento particular involucrado y/o el o los
25 agentes reductores de lípidos usados para el tratamiento. Una persona con experiencia en el arte apreciará que algunas veces es necesario realizar variaciones de rutina a la dosificación dependiendo de la edad y condición del paciente. La dosificación también dependerá de la ruta de
30 administración. Se contempla una variedad de rutas, que

incluyen oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inhalatoria, bucal, sublingual, intrapleural, intratecal, intranasal, y similares. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen polvos, aspersiones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. En una forma de realización, el primer compuesto y/o un agente reductor de lípidos se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, soluciones amortiguadoras, o propelentes que se requieran.

El término "dosis instantánea" se refiere a formulaciones que son formas de dosificación de dispersión fácil. El término "liberación inmediata" se define como una liberación de un agente terapéutico (tal como un primer compuesto o agente reductor de lípidos) de una forma de dosificación en un periodo relativamente breve de tiempo, en general de hasta aproximadamente 60 minutos. El término "liberación modificada" se define que incluye liberación retrasada, liberación prolongada, y liberación pulsada. El término "liberación pulsada" se define como una serie de liberaciones del fármaco de una forma de dosificación. El término "liberación sostenida" o "liberación prolongada" se define como liberación continua de un agente terapéutico de una forma de dosificación durante un periodo prolongado.

Un "sujeto" incluye mamíferos, por ejemplo, humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, pájaros, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves de corral, y similares), y

animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias, pájaros, y similares). En una forma de realización, el sujeto es humano. En un aspecto, el sujeto es hembra. En un aspecto, el sujeto es macho.

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

"Vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente que es útil para la preparación de una composición farmacéutica que en general es segura, no tóxica ni tampoco no deseable biológicamente ni de otra manera, e incluye un excipiente que es aceptable para el uso veterinario así como para el uso farmacéutico en humanos. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones incluye uno y más de uno de dichos excipientes.

A pesar de que es posible administrar el primer compuesto directamente sin ninguna formulación, el primer compuesto se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta formulación se puede administrar mediante una variedad de rutas incluyendo a las rutas oral, bucal, rectal, intranasal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, e intranasal.

En una forma de realización, el primer compuesto se puede administrar por vía transdérmica. Con el objetivo de administrarlo por vía transdérmica, es necesario un dispositivo de administración transdérmica ("parche"). Dichos parches transdérmicos se pueden usar para proveer una infusión continua o discontinua de un compuesto de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5,023,252. Dichos parches pueden construirse para una administración de los agentes farmacéuticos en forma continua, pulsátil, o a demanda.

En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se adapta para la administración bucal y/o sublingual, o para la administración nasal. Esta forma de realización provee la administración del primer compuesto en una manera que se evitan las complicaciones gástricas, tales como el metabolismo de primer paso mediante el sistema gástrico y/o a través del hígado. Esta ruta de administración también puede reducir los tiempos de absorción, proporcionando un inicio más rápido de los beneficios terapéuticos.

El primer compuesto se puede administrar a través de un amplio rango de dosificaciones. Por ejemplo, las dosificaciones diarias normalmente caen dentro del rango de entre aproximadamente 0.0001 y aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En el tratamiento de humanos adultos, se puede usar el rango de entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 15 mg/kg/día, en dosis individuales o

divididas. En una forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 0.1 mg y aproximadamente 1500 mg de un primer compuesto. En otra forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 100 mg de un primer compuesto. En otra forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 50 mg de un primer compuesto. En otra forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 30 mg de un primer compuesto. En otra forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 4 mg y aproximadamente 26 mg de un primer compuesto. En otra forma de realización, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 25 mg de un primer compuesto. Sin embargo, ha de comprenderse que la cantidad del primer compuesto que realmente se administre será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la ruta de administración seleccionada, la forma del primer compuesto administrado, el o los agentes reductores de lípidos administrados, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente. Por lo tanto, los rangos de dosificaciones anteriores no limitan el alcance de la invención de ninguna manera. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del rango antes indicado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial, con la condición de que dichas

dosis mayores se dividan primero en varias dosis más pequeñas para su administración a lo largo del día.

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

Tal como se usa en la presente, una "afección colestásica" se refiere a cualquier enfermedad o afección en donde está alterada o bloqueada la excreción de bilis
15 desde el hígado, la cual puede ocurrir en el hígado o en los ductos biliares. La colestasis intrahepática y la colestasis extrahepática son dos tipos de afecciones colestásicas. La colestasis intrahepática (que ocurre dentro del hígado) se ve más comúnmente en la cirrosis
20 biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la sepsis (infección generalizada), la hepatitis alcohólica aguda, la toxicidad por fármacos, la nutrición parenteral total (a través de alimentación por vía intravenosa), en
25 malignidad, fibrosis quística, atresia biliar, y en el embarazo. La colestasis extrahepática (que ocurre fuera del hígado) puede estar causada por tumores de los ductos biliares, estenosis, quistes, divertículos, formación de cálculos en el ducto biliar común, pancreatitis, tumor
30 pancreático o pseudoquiste, y compresión debida a una masa o tumor en un órgano cercano.

Los síntomas y signos clínicos de una afección colestásica incluyen: picazón (prurito), fatiga, piel u ojos ictéricos, incapacidad para digerir ciertas comidas, náuseas, vómitos, heces pálidas, orina oscura, y dolor abdominal en el cuadrante superior derecho. Un paciente con una afección colestásica puede diagnosticarse y seguirse clínicamente en base a un grupo de pruebas de laboratorio clínico estándares, incluyendo la medida de los niveles de fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), 5' nucleotidasa, bilirrubina, ácidos biliares, y colesterol en una muestra de sangre del paciente. En general, un paciente es diagnosticado con una afección colestásica si los niveles séricos de los tres marcadores diagnósticos, fosfatasa alcalina, GGT y 5' nucleotidasa, se consideran anormalmente elevados. El nivel sérico normal de estos marcadores puede variar en algún grado de laboratorio a laboratorio y de procedimiento a procedimiento, dependiendo del protocolo de la prueba. Por lo tanto, un médico será capaz de determinar, en base al laboratorio específico y al procedimiento de prueba específico, cuál es el nivel sanguíneo anormalmente elevado para cada uno de los marcadores. Por ejemplo, un paciente que sufre de una afección colestásica en general tiene más de aproximadamente 125 IU/L de fosfatasa alcalina, más de aproximadamente 65 IU/L de GGT, y más de aproximadamente 17 NIL de 5' nucleotidasa en la sangre. Debido a la variabilidad del nivel de los marcadores séricos, una afección colestásica puede diagnosticarse en base a los niveles anormales de estos tres marcadores además de por lo

menos uno de los síntomas que se mencionaron previamente, tales como picazón (prurito).

5 El término "cirrosis biliar primaria", con frecuencia abreviado como PBC, es una enfermedad autoinmune del hígado marcada por una destrucción progresiva lenta de los ductos biliares pequeños del hígado, con los ductos intralobulares (Canales de Hering) afectados en una etapa temprana de la enfermedad. Cuando estos ductos se dañan, se acumula bilis
10 en el hígado (colestasis) y con el tiempo se daña el tejido. Esto puede conducir a la formación de cicatrices, fibrosis y cirrosis. La cirrosis biliar primaria se caracteriza por la destrucción del ducto biliar interlobular. Los hallazgos histopatológicos de la cirrosis biliar primaria incluyen:
15 inflamación de los ductos biliares, que se caracteriza por linfocitos intraepiteliales, y granuloma epiteliode periductal. Existen 4 etapas de PBC.

Etapa 1 Etapa Portal: triadas de tamaño normal; inflamación portal, leve daño de los ductos biliares. En
20 esta etapa con frecuencia se detectan granulomas.

Etapa 2 Etapa Periportal: triadas dilatadas; fibrosis y/o inflamación periportal. Típicamente esta etapa se caracteriza por el hallazgo de una proliferación de los ductos biliares menores.

25 Etapa 3 Etapa Septal: septum fibroso activo y/o pasivo.

Etapa 4 Cirrosis Biliar: presencia de nódulos; en guirnalda.

30 El término "colangitis esclerosante primaria" (PSC) es una enfermedad de los ductos biliares que causa inflamación y subsiguiente obstrucción de los ductos biliares tanto a

nivel intrahepático (dentro del hígado) como extrahepático (fuera del hígado). La inflamación impide el flujo de bilis hacia el intestino, lo que finalmente puede conducir a una cirrosis del hígado, falla hepática y cáncer de hígado.

El término "esteatohepatitis no alcohólica" (NASH) es la inflamación del hígado causada por una acumulación de grasa en el mismo. En algunas personas, la acumulación de grasa produce una inflamación del hígado. Debido a la inflamación, el hígado no funciona como debería. La NASH puede empeorar y causar la cicatrización del hígado, lo que conduce a una cirrosis. La NASH es similar al tipo de enfermedad hepática causada por una adicción al alcohol de larga duración. Sin embargo, la NASH ocurre en personas que no abusan del alcohol.

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

Todas las publicaciones y documentos de patente que se citan en la presente se incorporan a la presente a modo de referencia como si cada publicación o documento estuviese específicamente e individualmente indicado como incorporado

a la presente a modo de referencia. La cita de las publicaciones y documentos de patente no es una admisión de que los mismos constituyan arte previo pertinente, ni tampoco constituye una admisión con respecto a los contenidos o fechas de los mismos. Habiéndose descrito la invención a modo de descripción escrita, las personas con experiencia en el arte reconocerán que la invención se puede practicar en una variedad de formas de realización y que la descripción y los ejemplos de la presente se proveen solo con propósitos ilustrativos y no como limitación de las reivindicaciones que se encuentran más adelante.

En la memoria descriptiva, las formas en singular también incluyen al plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos que se usan en la presente tiene el mismo significado comúnmente comprendido por las personas con experiencia en el arte al que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva será la que defina. Todos los porcentajes y proporciones que se usan en la presente, a menos que se indique de otra manera, se expresan en peso.

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelo de Ligadura de Ducto Biliar (BDL)

Este experimento se llevó a cabo para evaluar los efectos del OCA y la atorvastatina solos, y en combinación, sobre la fibrosis inducida por ligadura del ducto biliar común en ratones.

Animales, alojamiento y dieta

Se obtuvieron ratones C57BL/6 machos (6 semanas de edad) de Japan SLC. Se mantuvieron los animales en una

instalación libre de patógenos específicos bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad ($45 \pm 10\%$), iluminación (ciclos artificiales de luz y oscuridad de 12 horas; luz entre las 8:00 y las 20:00 horas), e intercambio de aire (tasa de intercambio de aire: más de 40 veces/hora). Se mantuvo una presión alta (20 ± 4 Pa) en la sala experimental para evitar la contaminación de las instalaciones. Los animales se alojaron en KN-600 (Natsume Seisakusho, Japón) con un máximo de 6 ratones por jaula. Se usó Paper-Clean esterilizado (Japan SLC) para el armado de los lechos y el mismo se reemplazó una vez por semana. Se proporcionaron una dieta sólida esterilizada de alto contenido en grasas (HFD) y agua *ad libitum* durante 3 semanas antes del día de la cirugía.

Grupos de Tratamiento

Grupo 1: Sham

Los ratones con operación control (n=8) recibieron administración por vía oral de vehículo (0.5% de CMC) en un volumen de 5 mL/kg una vez por día entre el día 0 y el día 6 después de la cirugía de BDL.

Grupo 2: BDL-Vehículo

Los ratones operados por BDL (n=12) recibieron administración por vía oral de vehículo (0.5% de CMC) en un volumen de 5 mL/kg una vez por día entre el día 0 y el día 6 después de la cirugía de BDL.

Grupo 3: BDL-OCA

Los ratones operados por BDL (n=12) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con OCA a una dosis de 5 mg/kg una vez por día entre el día 0 y el día 6 después de la cirugía de BDL.

Grupo 4: BDL-Atorvastatina

Los ratones operados por BDL (n=12) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con atorvastatina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre el día 0 y el día 6 después de la cirugía de BDL.

Grupo 5: OCA-BDL-Atorvastatina

Los ratones operados por BDL (n=12) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con OCA a una dosis de 5 mg/kg y atorvastatina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre el día 0 y el día 6 después de la cirugía de BDL.

Cirugía de Ligadura de Ducto Biliar

La cirugía de Ligadura de Ducto biliar se llevó a cabo en el día 0. La colestasis, que conduce a fibrosis del hígado con el tiempo, se estableció en los ratones mediante la ligadura del ducto biliar común bajo anestesia con pentobarbital. Se dividió a los ratones en dos cohortes quirúrgicas en base a su peso antes del día de la cirugía. Después de afeitar su pelo, se abrió la cavidad abdominal y se ligó el ducto biliar común dos veces con seda quirúrgica 5-0 y se cortó el ducto biliar común entre las ligaduras. Se cerraron el peritoneo y la piel con suturas. Se transfirieron los ratones a una jaula limpia (jaula de descanso) para recuperarse de la anestesia. Los ratones del grupo Sham se operaron de una forma similar a los otros grupos, pero sin ligar el ducto biliar.

Monitoreo y sacrificio de los animales

La viabilidad, los signos clínicos y el comportamiento se monitorearon en forma diaria. El peso corporal se

registró en forma diaria durante el periodo de tratamiento. El consumo de alimento se midió dos veces por semana en cada jaula durante el periodo de tratamiento. Al día 6, se sacrificaron los animales por exanguinación mediante punción cardiaca directa bajo anestesia con éter (Wako Pure Chemical Industries).

Análisis histológico

Para visualizar la deposición de colágeno, se tiñeron las secciones de hepáticas laterales izquierdas fijadas en solución de Bouin usando solución de rojo picrosirius (Waldeck, Alemania). Para el análisis cuantitativo del área de fibrosis, se capturaron imágenes de campo brillante de las secciones teñidas con rojo Sirius alrededor de la vena central usando una cámara digital (DFC295; Leica, Alemania) con una magnificación de 100 veces, y se midieron las áreas positivas en 5 campos/sección usando el programa de computadora ImageJ (National Institute of Health, EE.UU.). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa de computadora Prism Software 6 (GraphPad Software, Inc. EE.UU.).

Resultados

Se llevaron a cabo análisis histopatológicos en las secciones hepáticas (de acuerdo a métodos de rutina) por tinción con rojo Sirius para estimar el porcentaje de área de fibrosis. En las Figuras 1A a 1E se muestran fotomicrografías representativas de las secciones hepáticas teñidas con rojo Sirius. El grupo BDL-Vehículo mostró un incremento significativo del área positiva a rojo Sirius en comparación con el grupo BDL-Sham. Como se indica en la Tabla 1 y en la Figura 2, el grupo BDL-OCA + atorvastatina

mostró una disminución significativa del área positiva a rojo Sirius en comparación con el grupo BDL-Vehículo.

Tabla 1

5	Parámetro (media $\pm$ SD)	Sham (n=8)	BDL-Vehículo (n=11)	BDL-OCA (n=12)	BDL-ATO (n=12)	BDL OCA+ATO (n=12)
10	Área positiva a Rojo Sirius (%)	1.30 $\pm$ 0.45	2.17 $\pm$ 0.43	2.06 $\pm$ 0.37	2.31 $\pm$.63	1.60 $\pm$ 0.44 (p<0.05)

15 Los resultados de la Tabla 1 indican que la combinación de OCA y atorvastatina redujo en forma significativa la fibrosis.

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

20 Este experimento se llevó a cabo para evaluar los efectos del OCA y del fenofibrato, solos o combinados, sobre el desarrollo de NASH inducida por dieta y fibrosis hepática en ratones transgénicos APOE*3Leiden.CETP. Se llevaron a cabo un perfilamiento de expresión de genes hepáticos y un análisis subsiguiente de vías para
25 determinar si la combinación regula nuevos genes no regulados por ninguno de los tratamientos de monoterapia, y/o si regula más fuertemente a genes también influenciados por la monoterapia.

Animales, alojamiento y dieta

30 Se obtuvieron ratones transgénicos machos APOE*3Leiden.CETP (entre 9 y 21 semanas de edad) y se

alojaron de a entre 2 y 5 ratones por jaula. Se alimentaron los ratones con una dieta con alto contenido de grasas conteniendo 24% de grasa de cerdo y 1% (p/p) de colesterol. El periodo de administración fue de 15 semanas con dieta con alto contenido de grasas. En la semana 16, se agruparon los ratones en base a la edad, el peso corporal, el colesterol y los triglicéridos plasmáticos después de 4 h de ayuno.

10 *Grupos de Tratamiento*

Grupo 1: Tratamiento inicial del grupo de referencia con HFC

15 Se alimentó a los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas durante el periodo experimental entre las semanas 0 y 14.

Grupo 2: Grupo control con HFC

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas entre las semanas 0 y 24.

20 Grupo 3: HFC + OCA

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas suplementada con OCA a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre las semanas 16 y 24.

25 Grupo 4: HFC + fenofibrato en dosis baja

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas suplementada con fenofibrato a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre las semanas 16 y 24.

30 Grupo 5: HFC + fenofibrato en dosis alta

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas suplementada con fenofibrato a una dosis de 40 mg/kg una vez por día entre las semanas 16 y 24.

5

Grupo 6: HFC + OCA + fenofibrato en dosis baja

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas suplementada con OCA a una dosis de 10 mg/kg una vez por día y fenofibrato a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre las semanas 16 y 24.

10

Grupo 7: HFC + OCA + fenofibrato en dosis alta

Se alimentaron los ratones (n=15) con una dieta con alto contenido de grasas suplementada con OCA a una dosis de 10 mg/kg una vez por día y fenofibrato a una dosis de 40 mg/kg una vez por día entre las semanas 16 y 24.

15

Grupo 8: Grupo control con dieta normal

Se alimentaron los ratones (n=8) con una dieta normal entre las semanas 0 y 24.

20

Diseño del Estudio

Se alimentaron los ratones con una dieta con alto contenido de grasas (HFC) durante 14 semanas. Después de 15 semanas con la dieta HFC, se agruparon los ratones del grupo HFC en 7 grupos en base a la edad, el peso corporal, el colesterol y los triglicéridos plasmáticos después de 4 horas de ayuno. Los ratones se trataron con OCA y fenofibrato, solos o en combinación, comenzando en la semana 15 y se sacrificaron en la semana 25 en estado no ayunado. Una semana antes del sacrificio, se marcaron los ratones con D₂O, mediante inyección i.p. de un bolo de D₂O

25

30

y agregado subsiguiente de 4% de D₂O al agua de bebida. Se obtuvo plasma (EDTA) mediante punción cardíaca y se almacenó a -70°C. Se pesó el hígado y se tomaron 4 piezas del mismo: 1 pieza (lóbulo medio) se fijó en 10% de formalina (para histología de NASH y fibrosis) y 3 piezas (lóbulo izquierdo) se congelaron en forma rápida en N₂ líquido y se almacenaron individualmente a -70°C.

Puntuación de Inflamación Hepática

La inflamación es una característica clave de la NASH. Se categorizó la inflamación de acuerdo al procedimiento de Liang y col., PlosOne 2014 Dec, 9(12) y se puntuó mediante análisis cuantitativo del número de agregados de células inflamatorias. En particular, se evaluó el nivel de inflamación mediante el conteo del número de focos inflamatorios por campo usando una magnificación de 100 x (tamaño de vista de 3.1 mm²; promedio de cinco campos diferentes).

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

Se investigaron los efectos del OCA a 10 mg/kg solo y en combinación con fenofibrato (10 y 40 mg/kg) sobre la inflamación en ratones APOE*3-Leiden. CETP con una dieta inductora de NASH. Después de 10 semanas de administración de fármaco a la dosis baja, ni el OCA (10 mg/kg) ni el fenofibrato (10 mg/kg) redujeron el número de focos de células inflamatorias (Figuras 3A y 3B y Tabla 2). Por el contrario, la combinación disminuyó en forma significativa la inflamación en relación al grupo con vehículo, así como también en relación a cada rama de monoterapia. Una dosis mayor de fenofibrato (40 mg/kg/d) también redujo en forma

significativa la inflamación en relación a los controles con vehículo. En combinación con el OCA, no se observaron efectos antiinflamatorios adicionales debido a que la dosis alta de fenofibrato ejerció un efecto casi máximo por sí sola. En resumen, se observó una reducción significativa de la inflamación con la combinación de OCA + fenofibrato en dosis baja (-63%). Más aún, se observó una reducción significativa con la dosis alta de fenofibrato (-74%) y una reducción similar para la combinación con OCA (-79%). Véanse la Tabla 2 y las Figuras 3A y 3B.

Tabla 2

Grupo	Inflamación (# de focos de células inflamatorias)
Grupo 1: Grupo de referencia con HFC	24.3 ± 17.3
Grupo 2: Grupo control de HFC	27.5 ± 18.0 (n=15)
Grupo 3: OCA	29.1 ± 22.7
Grupo 4: fenofibrato en dosis baja	22.0 ± 15.6
Grupo 5: fenofibrato en dosis alta	7.1 ± 5.9
Grupo 6: OCA + fenofibrato en dosis baja	10.0 ± 7.0
Grupo 7: OCA + fenofibrato en dosis alta	5.1 ± 7.0
Grupo 8: Dieta control	0.8 ± 0.4

Los resultados de la Tabla 2 sugieren que la eficacia de la combinación de OCA y la dosis alta de fenofibrato es

producto de la dosis alta de fenofibrato y alcanza un límite superior.

Aislamiento y secuenciación de ARN

5 La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo como se describió previamente en detalle (Verschuren y col., 2014). En forma breve, se extrajo el ARN total de las muestras individuales de hígado usando esferas de vidrio y RNAzol (Campro Scientific, Veenendaal, Países Bajos). Se determinó la concentración y la calidad del ARN usando el
10 Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, EE.UU.) y el kit RNA 6000 Nano Lab-on-a-Chip y un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). Todas las muestras cumplieron con los requerimientos de calidad y se usaron en el procedimiento de secuenciación de ARN.

15 Se usó el NEBNext Ultra Directional RNA library Prep Kit for Illumina para procesar las muestras. La preparación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo al protocolo "NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for
20 Illumina" (NEB#E7420S/L). En forma breve, se aisló el ARNm a partir del ARN total usando esferas magnéticas con oligo-dT. Después de la fragmentación del ARNm, se llevó a cabo la síntesis del ADNc. Este se usó para la ligadura de los adaptadores de secuenciación y la amplificación por PCR del
25 producto resultante. La calidad y el rendimiento después de la preparación de las muestras se midieron con el Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, EE.UU.). El tamaño de los productos resultantes fue consistente con la distribución de tamaños esperada (un pico ancho entre 300y
30 500 pb).

El agrupamiento y la secuenciación de ADN usando el Illumina NextSeq 2500 se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante. Los datos se generaron usando el protocolo de secuenciación de lecturas de extremos individuales obteniendo aproximadamente 15 millones de lecturas por muestra y 75 pb por lectura. El análisis de imágenes, la asignación de bases, y la verificación de calidad se llevaron a cabo con el conjunto de herramientas de análisis de datos de Illumina RTA v2.4.11 para generar los datos crudos (*.fastq-files).

Se mapearon las lecturas a la secuencia de referencia GRCh38.p3 de *Mus musculus* usando un alineador de lecturas cortas en base a la Burrows-Wheeler Transform. Se usó una tasa de no coincidencias por omisión de 2% (3 no coincidencias en una lectura de 150 bases). En base a las localizaciones de las lecturas mapeadas en los archivos de alineamiento (*.bam-files), se determinó la frecuencia del mapeo de una lectura para un transcripto. Los conteos se registraron como archivos de conteo, los cuales sirvieron como entrada para el subsiguiente análisis de expresión diferencial de ARNmsec. Los conteos de las lecturas se cargaron en el paquete de programas DESeq, un paquete estadístico dentro de la plataforma R. El DESeq se desarrolló específicamente para normalizar los datos de ARNmsec para diferentes muestras y para hallar los genes diferencialmente expresados entre dos afecciones para los datos de ARNmsec, para estimar la relación entre la media y la varianza de cada gen (Anders y col., 2013). Más aún, el mismo permite introducir fácilmente factores de escala en la prueba estadística. Los genes diferencialmente

expresados se identificaron usando un valor umbral para una significancia de $P < 0.01$, y se usaron los genes como datos de entrada para el análisis de vías mediante el paquete de programas Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (con acceso en el año 2016).

El análisis de reguladores corriente arriba se llevó a cabo usando el programa de computadora IPA (Kramer y col., 2014). Este análisis determina el estado de activación de factores de transcripción en base a la expresión génica diferencial observada. Esto resulta en un valor P de superposición y una puntuación z de activación para cada factor de transcripción en la base de datos IPA. El valor P de superposición indica la significancia de la superposición entre los genes blancos conocidos de un factor de transcripción y los genes diferencialmente expresados que se midieron en un experimento. La puntuación de activación z indica la activación (puntuación z positiva) o la inhibición (puntuación z negativa) de un factor de transcripción particular. Una puntuación de activación z < -2 o > 2 indica una inhibición o activación significativa de una vía o proceso.

Resultados de Estudios Ómicos

Se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento sobre las muestras de ARNm hepático a partir de los ratones tratados para dilucidar los mecanismos y vías subyacentes. Se llevaron a cabo dos análisis para dilucidar los mecanismos y vías subyacentes.

Primero, un análisis de enriquecimiento de las vías canónicas reveló que el OCA regula procesos inflamatorios severos (Figura 6A). La figura muestra un gráfico de cada

vía en función del $-\log$ del valor p (como referencia, un valor transformado para $p < 0.05$ es 1.3, para $p < 0.0001$ es 4, para $p < 0.000005$ es 5.3 etc.). Las vías reguladas con la monoterapia con OCA se relacionaron con la señalización de células T y B, la señalización de extravasación de los leucocitos, la señalización de células asesinas naturales, etc. La dosis baja de fenofibrato no tuvo efecto sobre estas vías. Cuando se combinó el OCA con la dosis baja de fenofibrato, algunas de estas mismas vías se vieron fuertemente reguladas (en el caso de la señalización de iCOS-iCOSL en las células T colaboradoras, señalización de extravasación de leucocitos, receptores de reconocimiento de patrones, fagocitosis mediada por receptores FC en macrófagos, y formación de fagosomas). Además, otras vías (por ejemplo, biosíntesis de colesterol I y II, beta oxidación de ácidos grasos) que no estaban reguladas en forma significativa por ninguno de los agentes solos, se vieron reguladas por la combinación (Figura 6B). Como con los datos histológicos, la dosis alta de fenofibrato tuvo un efecto robusto sobre estas vías, pero no se potenció por la coadministración de OCA.

Se llevó a cabo un análisis más detallado alrededor de las vías implicadas en la señalización de extravasación de leucocitos. La extravasación de los leucocitos es esencial para los procesos patofisiológicos en la NASH (y en otras enfermedades). Estos procesos incluyen la migración de los linfocitos T para la vigilancia inmunológica, el reclutamiento de linfocitos y granulocitos activados durante las respuestas inflamatorias agudas y crónicas, y el alojamiento y

movilización de las células progenitoras hematopoyéticas. Los efectos del tratamiento de los ratones con una dieta con alto contenido de grasas a partir de este estudio ilustran estos procesos, en donde los genes con aumento y disminución significativa de la expresión. La Tabla 3 describe los efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre la señalización de extravasación de leucocitos en ratones alimentados con una dieta con alto contenido de grasas en relación a ratones alimentados con una dieta estándar, y también los efectos del tratamiento de combinación en relación a la dieta con alto contenido de grasas.

Tabla 3

Gen	Nombre(s) completo(s)	Función predicha	Regulado en forma significativa por la dieta inductora de NASH versus la Dieta Control	Regulado en forma significativa por Combo vs. la dieta inductora de NASH
CD43	Agrupamiento de diferenciación 43 o leucosialina	Sialoglicoproteína mayor que se localiza en la superficie de los linfocitos T, monocitos, granulocitos y algunos linfocitos B.	↑	↓
CD44	Agrupamiento de diferenciación 44	Glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración.	↑	↓
CDH5	Cadherina 5 o	Imparte a las células	↑	↔

5		CD144	la capacidad para adherirse en forma hemofilica y controla la cohesión y la organización de las uniones intercelulares		
	CRK	CT10 regulador de quinasa o p38	Proteína adaptadora en vías de señalización intracelulares	↓	↔
10	CXCR4	Receptor 4 de Quimoquina con motivo C-X-C o CD184	Receptor para actividad quimiotáctica para linfocitos	↑	↓
	ERM	Familia de Proteínas Exrina, Radixzina, Moesina	Entrecruza los filamentos de actina con las membranas plasmáticas	↓	↓
15	EPAC	Proteína de intercambio activada por AMPc	Sensores intracelulares de AMPc	↓	↔
	ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1 o CD54	Glicoproteína de superficie celular que se une a integrinas	↑	↓
20	ITGA4	Subunidad alfa de integrina	Subunidad grande del receptor de alojamiento de linfocitos a4b1	↑	↓
	ITGAL	Integrina alfa L o CD11A	Adhesión celular y señalización coestimuladora	↑	↓
25	ITGAM	Integrina Alfa M o CD11B	Regula la adhesión y la migración de leucocitos	↑	↓
30	ITGB1	Integrina Beta-1 o CD29	Integrinas que participan en adhesión celular y señalización mediada por la superficie celular	↓	↔

5	ITGB2	Integrina Beta-2 o CD18	Integrinas que participan en adhesión celular y señalización mediada por la superficie celular	↑	↓
10	JAM2	Molécula de adhesión de uniones 2 o CD322	Ligando adhesivo para interaccionar con múltiples tipos celulares inmunes y alojamiento de linfocitos	↑	↔
15	JAM3	Molécula de adhesión de uniones 3	Se une a JAM2 en la regulación de la adhesión	↓	↔
20	LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos 1	Molécula de adhesión en células T, células B, macrófagos y neutrófilos	↔	↓
25	NCF 1	Factor citosólico de neutrófilos -1	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos	↑	↓
30	NCF2	Factor citosólico de neutrófilos -2	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos	↑	↓
	NCF4	Factor citosólico de neutrófilos -4	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos	↑	↓
	NOX	NADPH oxidasa	Enzimas que transportan electrones a través de la membrana plasmática y generan superóxidos y especies reactivas de oxígeno corriente abajo	↑	↓
	PECAM1	Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria o	Transmigración de leucocitos, angiogénesis, y activación de	↑	↔

5

10

15

20

25

30

	CD31	integrina		
PKC	Proteína quinasa C	Parte de la familia de enzimas que controlan la fosforilación de los aminoácidos serina y treonina de otras proteínas	↔	↔
PI3K	PI3-quinasa	Las PI3K son una familia de enzimas relacionadas transductoras de señal intracelular	↔	↓
PLC	Fosfolipasa C	Cataliza la formación de inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5bifosfato	↔	↓
PSGL-1	Ligando 1 de glicoproteína P-selectina	Rol en tráfico de leucocitos durante la inflamación mediante el anclaje de leucocitos a plaquetas activadas o endotelio que expresa selectinas	↑	↓
Rac2	Sustrato de toxina botulínica C3 relacionado con Ras	Regula diversos eventos celulares incluyendo crecimiento, reorganización del citoesqueleto y activación de proteína quinasas	↑	↓
RASGRP1	Proteína liberadora de RAS nucleótido de guanina	Activa la cascada de Erk/MAP quinasa y regula el desarrollo, la homeostasis y la diferenciación de células T y B	↑	↓

	RhoH	Gen H homólogo de Ras	Regula la dinámica de la actina intracelular	↑ ↓
5	RhoGAP	RHO GTPasas	Dominio proteico de las proteínas activadoras de GTPasa	↔ ↓
	SPA-1	Proteína 1 asociada a proliferación inducida por señal	Puede impedir el ciclo celular inducido por mitógenos cuando se expresa en forma anormal	↑ ↔
10	THY-1	Antígeno de diferenciación de timocitos 1 o CD90	Interacciones célula-célula y célula-matriz, puede influenciar el crecimiento de neuritas, la regeneración de nervios, la apoptosis, la metástasis, la inflamación y la fibrosis	↑ ↓
15				
	TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa	Se une e inactiva a las metaloproteinasas tisulares	↔ ↓
20	VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	Implicada en vías de señalización intracelular que regulan las interacciones integrina-matriz extracelular	↑ ↓
25	VAV	VAV	Un protooncogén que media la activación inducida por antígenos de los linfocitos B	↑ ↓
30	VCAM1	Proteína de adhesión celular vascular 1 o CD106	Adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos, y basófilos al endotelio	↑ ↓

		vascular		
WASP	(Síndrome de Wiskott-Aldrich)	Importante en la movilidad de los leucocitos <i>in vivo</i>	↔	↓

5 La trans migración y extravasación de los leucocitos a través del endotelio ocurre en varios pasos discretos que incluyen el rodaje de los leucocitos a lo largo de las células endoteliales, mediado por interacciones débiles transitorias entre las moléculas de adhesión.

10 Subsiguientemente, los leucocitos débilmente unidos están en una proximidad tal con el endotelio que los mismos son activados por las citoquinas quimiotácticas que se presentan en la superficie apical del endotelio. Luego, los leucocitos activados se extienden y se adhieren firmemente

15 al endotelio formando estructuras de acoplamiento y por último migrando a través de las hendiduras intercelulares que hay entre las células endoteliales, hacia el tejido subyacente.

20 La administración del OCA disminuye la expresión de numerosos genes implicados en este proceso de cascada inflamatoria dentro del leucocito (WAP, Rac2, RASGRP1, Vav, PKC, PI3K, ERM, ITGAL y PSGL-1) así como dentro de las células endoteliales (VCAM1, PI3K, ERM, NOX, CYBA, PKC, NCF1 y 2). La regulación de genes dentro de estas vías no

25 se observó después de la administración de una dosis baja de fenofibrato solo.

30 Cuando el OCA se combinó con una dosis de fenofibrato que era ineficaz para regular estas vías, se observó la regulación de múltiples genes adicionales, apuntando a un efecto sinérgico. Dentro del leucocito, estos genes adicionales incluyeron a CD43, PSGL-1, CXCR4, ITGAM, ITGB2,

Rap1, ITGA4. En las células endoteliales, estos genes adicionales incluyeron a ICAM1, RhoGAP, VASP, NCF4, ITGAM, ITGB2, ITGA4 e ICAM-1.

5 Como se indicó anteriormente, la dosis alta de fenofibrato tuvo numerosos efectos sobre esta vía que no se vieron potenciados con la coadministración de OCA. Todos los análisis subsiguientes se focalizaron en las monoterapias con dosis baja y en la combinación (OCA 10 mg/kg +/- fenofibrato 10 mg/kg).

10 En un segundo análisis, se compararon los genes regulados diferencialmente entre la combinación con dosis baja y cada respectiva monoterapia. Este análisis difiere del primer análisis de expresión génica (descrito previamente) que se focalizó en las comparaciones relativas al grupo con vehículo; el análisis siguiente compara cada monoterapia con la combinación. El diagrama de Venn (Figura 7A) muestra que el OCA tiene 109 genes únicos regulados, el fenofibrato tiene 92 genes únicos regulados y 6 genes regulados en común. La combinación reguló 517 genes superpuestos con el OCA, 75 con el fenofibrato, y 5 genes fueron comunes para todos los grupos. Para destacar, la combinación reguló un total de 912 genes únicos. Un enriquecimiento de vías de señalización subsiguiente destaca los procesos biológicos en donde están involucrados los genes regulados por la combinación (Figura 7B).

25 Se llevaron a cabo análisis subsiguiente de vías tanto para la extravasación de leucocitos (o sea, como se hizo antes, pero esta vez las comparaciones son entre la combinación y cada monoterapia). Para la extravasación de leucocitos, las comparaciones de la combinación versus cada

monoterapia revelaron que hay varios genes regulados únicos en consistencia con los cambios antiinflamatorios potenciados observados vistos mediante histología en los ratones tratados con la combinación (Tabla 4).

Tabla 4.

Gen	Nombre(s) completo(s)	Función predicha	Combinación versus Monoterapia con Fenofibrato	Combinación versus con Monoterapia OCA
CD44	Agrupamiento de diferenciación 44	Glicoproteína de superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración		↓
CXCR4	Motivo de receptor C-X-C de Quimoquina 4 o CD184	Receptor para actividad quimiotáctica para linfocitos		↓
CYBA1	Citocromo b(-245)	Codifica para una cadena liviana del citocromo b(-245) que es un componente del complejo NOX		↓
ERM	Familia de Proteínas Exrina, Radixzina, Moesina	Entrecruza los filamentos de actina con las membranas plasmáticas		↓
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1 o CD54	Glicoproteína de superficie celular que se une a integrinas	↓	↓
ITGA4	Subunidad alfa de integrina	Subunidad grande del receptor de alojamiento de linfocitos a4b1	↓	↓
ITGAL	Integrina alfa L o CD11A	Adhesión celular y señalización coestimulatoria		↓

	ITGAM	Integrina Alfa M o CD11B	Regula la adhesión y la migración de leucocitos		↓
5	ITGB2	Integrina Beta-2 o CD18	Integrinas que participan en adhesión celular y señalización mediada por la superficie celular	↓	↓
	LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos 1	Molécula de adhesión en células T, células B, macrófagos y neutrófilos	↓	↓
10	MMP9	Metaloproteinasa de matriz 9	Degrada colágeno de la matriz extracelular		↓
	NCF1	Factor citosólico de neutrófilos -1	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos		↓
15	NCF2	Factor citosólico de neutrófilos-2	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos		↓
	NCF4	Factor citosólico de neutrófilos-4	Una subunidad de la NADPH oxidasa de neutrófilos		↓
20	NOX	NADPH oxidasa	Enzimas que transportan electrones a través de la membrana plasmática y generan superóxidos y especies reactivas de oxígeno corriente abajo		↓
25	PKC	Proteína quinasa C	Parte de la familia de enzimas que controlan la fosforilación de los aminoácidos serina y treonina de otras proteínas		↓
30	PI3K	PI3-quinasas	Las PI3K son una familia de enzimas relacionadas	↓	↓

		transductoras de señal intracelular		
5	PLC □	Fosfolipasa C	Cataliza la formación de inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5bifosfato	↓
10	PSGL-1	Ligando 1 de glicoproteína P-selectina	Rol en tráfico de leucocitos durante la inflamación mediante el anclaje de leucocitos a plaquetas activadas o endotelio que expresa selectinas	↓
15	Rac2	Sustrato de toxina botulínica C3 relacionado con Ras	Regula diversos eventos celulares incluyendo crecimiento, reorganización del citoesqueleto y activación de proteína quinasas	↓
20	Rap1GAP	Proteína 1 activadora de RAP 1 GTPasa	RAP1 tiene un interés particular debido a que se ha demostrado que es un antagonista de RAS y que es capaz de suprimir la transformación celular	↓
25	RASGRP1	Proteína liberadora de RAS nucleótido de guanina	Activa la cascada de Erk/MAP quinasa y regula el desarrollo, la homeostasis y la diferenciación de células T y B	↓
30	RhoH	Gen H homólogo de Ras	Regula la dinámica de la actina intracelular	↓
	RhoGAP	RHO GTPasas	Dominio proteico de las proteínas activadoras de GTPasa	↓

	TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa	Se une e inactiva a las metaloproteinasas tisulares		↓
5	VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	Implicada en vías de señalización intracelular que regulan las interacciones integrina-matriz extracelular		↓
10	VAV	VAV	Un protooncogén que media la activación inducida por antígenos de los linfocitos B		↓
	VCAM1	Proteína de adhesión celular vascular 1 o CD106	Adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos, y basófilos al endotelio vascular		↓
15	WASP	(Síndrome de Wiskott-Aldrich)	Importante en la movilidad de los leucocitos <i>in vivo</i>		↓

Dada la progresión desde la inflamación a la fibrosis en la NASH, y la observación de que las vías de fibrosis hepática/HSC emergieron como reguladas en forma significativa por la combinación, los inventores también examinaron las vías en HSC. En comparación con la monoterapia, es claro que se regulan más genes mediante la combinación versus el fenofibrato solo, y que se regulan menos genes mediante la combinación versus el OCA. En otras palabras, con respecto a estas vías fibróticas, claramente existe una interacción entre ambos agentes, pero la parte de la combinación atribuible al OCA puede ser la que produce más fuertemente estos efectos.

Interpretación y Relevancia

La importancia de la activación del FXR en la prevención de la fibrosis y la inflamación se demuestra en hígados de ratones *knockout* para FXR que muestran una elevada expresión de genes inflamatorios (Kim 2007) con
5 daño progresivo relacionado con la edad e inflamación (Yang 2007). En consistencia con estos informes, el OCA ejerció propiedades antiinflamatorias en células HepG2 y en hepatocitos primarios de ratón. Las células HepG2
10 pretratadas con OCA y luego expuestas a estímulos proinflamatorios mostraron entre 50% y 60% de reducción de los niveles de ARNm de TNF- α , inducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) estimulada por TNF- α . De forma similar, los
15 hepatocitos primarios tratados con OCA mostraron una menor inducción (entre 40% y 50%) de iNOS y de la expresión del gen de la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) en respuesta a estímulos proinflamatorios (Wang 2008). Los efectos del OCA sobre los mecanismos de migración celular
20 no se han estudiado directamente, sin embargo el OCA inhibió la producción de iNOS o COX-2 inducida por IL-1 β y anuló la migración de células de músculo liso aórtico de rata inducida en forma farmacológica (Li 2007). Se ha
demostrado una inhibición similar de infiltrados
25 inflamatorios con OCA en el tejido intestinal de dos modelos animales de enfermedad de intestino inflamatorio (DSS y ácido trinitrobenceno sulfónico) (Gadaleta 2011) y en riñón de un modelo de rata de diabetes de Tipo 1 (Wang 2010). Por lo tanto, la observación de mayores efectos
30 antiinflamatorios por el OCA sugiere que los cambios en la expresión génica con el OCA en combinación con el

fenofibrato podrían aumentar la inhibición de la inflamación y la migración de las células inflamatorias en varias afecciones patológicas.

5 **Ejemplo 3:** NASH inducida por dieta en ratones ob/ob deficientes en leptina

Este experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de 8 semanas de tratamiento con el OCA y atorvastatina solos y en combinación, sobre el estadio de fibrosis (pre biopsia vs. post biopsia) en ratones machos ob/ob deficientes en leptina, con NASH.

Animales, alojamiento y dieta

Se adquirieron ratones machos *Lep^{ob}/Lep^{ob}* (de 5 semanas de edad) de Janvier, Francia. Durante el periodo de aclimatación e inducción por dieta, se agruparon los ratones de a cinco por jaula en gabinetes hechos a medida bajo un ciclo 12:12 de luz y oscuridad (luces encendida entre las 3AM y 3PM) en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; $50 \pm 10\%$ de humedad relativa). A lo largo de todo el periodo de inducción con dieta y de estudio, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta para NASH hecha a medida (S8189, Ssniff, Alemania) (40% de grasa, 40% de carbohidratos (20% de fructosa) y 2% de colesterol) o dieta estándar para roedores (ob/ob-CHOW) (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca), y agua corriente. Se mantuvieron los animales con la dieta durante un total de 18 semanas antes de la intervención, y luego se mantuvieron con la dieta a lo largo de todo el periodo de estudio. Los animales se alojaron en forma individual durante la recuperación post operatoria y a lo largo del periodo de estudio.

Grupos de Tratamiento

Grupo 1: Lep^{ob}/Lep^{ob} -NASH Vehículo

5 Los ratones (n=10) recibieron administración por vía oral de vehículo (0.5% de CMC) en un volumen de 5 mL/kg una vez por día entre las semanas 0 y 8.

Grupo 2: Lep^{ob}/Lep^{ob} -NASH OCA

10 Los ratones (n=10) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con OCA a una dosis de 30 mg/kg una vez por día entre las semanas 0 y 8.

Grupo 3: Lep^{ob}/Lep^{ob} -NASH

15 Los ratones (n=11) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con Atorvastatina a una dosis de 10 mg/kg una vez por día entre las semanas 0 y 8.

Grupo 4: Lep^{ob}/Lep^{ob} -NASH OCA + Atorvastatina

20 Los ratones (n=9) recibieron administración por vía oral de vehículo suplementado con una combinación de OCA a una dosis de 30 mg/kg y Atorvastatina a una dosis de 30 mg/kg una vez por día.

Localización en grupos de estudio, randomización estratificada y monitoreo de estado basal

25 Después de 15 semanas de inducción con dieta (3 semanas antes del comienzo del estudio), se obtuvo una biopsia de hígado para evaluación de la progresión hepática de fibrosis y esteatosis, y para evaluación de la etapa de la fibrosis hepática. En la semana -1, se llevó a cabo una randomización estratificada en grupos de tratamiento de acuerdo a la etapa de la fibrosis hepática, la puntuación de esteatosis y el peso corporal.

30

Procedimiento de pre biopsia

En el día de la operación, se anestesiaron los ratones con isoflurano (entre 2 y 3%) en 100% de oxígeno. Se hizo una pequeña incisión abdominal en la línea media y se expuso el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se extirpó una cuña de forma cónica de tejido hepático (~100 mg) a partir de la parte distal del lóbulo, se pesó, y se fijó en 4% de paraformaldehído (PFA) para histología. La superficie cortada del hígado se electrocoaguló en forma instantánea usando coagulación bipolar (unidad electroquirúrgica ERBE VIO 100). Se retornó el hígado a la cavidad abdominal y se suturó el abdomen y se cerró la piel con grampas. El día de la operación, los ratones recibieron solución salina entibida (0.5 ml) para su rehidratación. Para la recuperación post operatoria, se administraron carprofeno (5 mg/ml - 0.01 ml/10g) y enrofloxazina (5 mg/ml - 1 ml/kg) por vía subcutánea el día de la operación y en los días postoperatorios 1 y 2.

Prescripción para evaluación de nivel hepático de esteatosis y fibrosis

Preparación de biopsia de hígado para evaluación histológica: después de un almacenamiento durante una noche en 4% de PFA, las biopsias de hígado se infiltraron durante una noche en parafina en un Miles Scientific Tissue-TEK VIP Tissue Processor automático y subsiguientemente se embebieron en bloques de parafina. Las biopsias de cinco animales diferentes se embebieron en un mismo bloque. Luego se recortaron los bloques y se hicieron dos secciones de 3 µm (una para rojo Sirius y una para tinción con H&E) en un Microm HM340E Microtome (Thermo Scientific). Se colocaron dos bloques en un portaobjetos dando un total de 10

biopsias por portaobjetos representando a 10 animales diferentes. Se dejaron secar las secciones durante una noche. La evaluación de la etapa de fibrosis para
5 estratificación y randomización a los grupos de tratamiento se llevaron a cabo como se describe en Kleiner y col. (2005) (véase más adelante).

Biomarcadores plasmáticos de estado basal y final

Se obtuvieron muestras de sangre para medir los
10 niveles sin ayuno (alimentado) de triglicéridos a la mañana (entre 7 y 8 AM) en estado basal y en la semana 8 de tratamiento. Las muestras de sangre se recolectaron a partir de la vena de la cola (mediante corte con tijeras) en estado consciente. La última dosis de fármaco se
15 administró ~18 horas antes del muestreo de sangre. Se alimentó nuevamente a los ratones después del muestreo de sangre. *Terminación y necropsia*

Se sacrificaron los animales en la semana 8 en estado alimentado. La última dosis de fármaco se administró ~18
20 horas antes de la terminación y los animales no recibieron más dosificaciones de fármaco antes de la terminación. Se indujo a los animales con CO₂/O₂ y durante la anestesia (isoflurano) se abrió la cavidad abdominal y se obtuvo sangre cardiaca para la recolección del plasma terminal.
25 Durante la necropsia, se recolectó el hígado completo y se pesó. Se tomó una biopsia del lóbulo lateral izquierdo y se fijó en 4% de PFA para histología y análisis bioquímico. Se dividió el lóbulo medio en piezas y estas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para el análisis
30 bioquímico (TG). El resto del tejido hepático se fijó

subsiguientemente en 4% de PFA para una histología posterior opcional.

Procesamiento del tejido hepático

5 Biopsia de pre estudio: aproximadamente tres semanas antes del comienzo del estudio, se tomó una cuña en forma cónica de tejido hepático (~100 mg) a partir de la parte distal del lóbulo lateral izquierdo, se pesó y se colocó inmediatamente en 4% de PFA.

10 Tejido hepático terminal: después de 8 semanas de tratamiento, se recolectó el hígado completo, se pesó y se tomó una biopsia de hígado del lóbulo lateral izquierdo y se colocó inmediatamente en 4% de PFA (~150-200 mg). Se congelaron rápidamente piezas de lóbulo medio en criotubos (ARNsec) (~100 mg) y en tubos FastPrep para TG (~100 mg) y
15 para TC (~50 mg).

Fijación, imbibición y secciones para histología: Después de una fijación de una noche en 4% de PFA, las biopsias de hígado se infiltraron durante una noche en
20 parafina en un Miles Scientific Tissue-TEK VIP Tissue Processor automático y subsiguientemente se embebieron en bloques de parafina. Las biopsias de cinco animales diferentes se embebieron en un mismo bloque. Se recortaron los bloques y se hicieron dos secciones de 3 µm por bloque
25 en un Microm HM340E Microtome (Thermo Scientific). Se colocó en un portaobjetos una sección de dos bloques diferentes dando un total de 10 biopsias por portaobjetos, como se indicó previamente.

Etapas de fibrosis

30 Se recolectaron la pre biopsia de hígado y el tejido de post biopsia del lóbulo lateral izquierdo para la

evaluación de la etapa de fibrosis mediante el uso de los criterios clínicos de Kleiner y colegas (Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, Kleiner y col, Hepatology 41; 2005) y que se reproducen en la Tabla 5 siguiente. La Figura 4 describe el efecto del OCA y la atorvastatina solos y en combinación sobre la puntuación de fibrosis. La combinación del OCA y la atorvastatina muestra una tendencia hacia la disminución de la puntuación de fibrosis a pesar de que no en una forma significativa, en comparación con el vehículo (valor $p = 0.09$).

Tabla 5

Característica	Grado	Puntuación
Fibrosis	Ninguno	0
	Perisinusoidal o periportal	1
	Leve, zona 3, perisinusoidal	1A
	Moderado, zona 3, perisinusoidal	1B
	Portal/periportal	1C
	Perisinusoidal y portal/periportal	2
	Fibrosis en puente	3
	Ninguno	0

Triglicéridos plasmáticos

Niveles de Triglicéridos: se recolectaron 100 μ l de sangre en tubos con Litio-Heparina. Se separó el plasma y se almacenaron las muestras a -80 grados Celsius hasta su análisis. Se midieron los niveles de triglicéridos en

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

Ejemplo 4: Cultivo de Hepatocitos en Sándwich

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

Reactivos y Soluciones

El medio de cultivo celular adecuado incluye MB-752/1 de Waymouth, F12 de Ham, RPMI 1640, medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio E de Williams, medio L15 de Leibovitz y medio de Chee modificado. La collagenasa de Tipo IV, el colágeno de tipo I, el Percoll, el medio de cultivo y los suplementos que se agregan al medio de cultivo (por ejemplo, suero, antibióticos, aminoácidos, hormonas tales como DEX, insulina, y factores de crecimiento), la solución amortiguadora de perfusión, y otras soluciones estaban comercialmente disponibles o se hicieron a partir de materiales comercialmente disponibles. Se pueden usar otros tipos de colágeno (tipos II-IV), laminina, fibronectina y proteoglicanos de heparán sulfato en el cultivo de hepatocito en sándwich. Sin embargo, se ha demostrado que los colágenos de tipo I y IV son superiores a la fibronectina y a laminina.

Aislamiento de hepatocitos

Se utilizará un método de perfusión con colagenasa en dos pasos *in situ* para aislar los hepatocitos. En forma breve, se aislarán los hepatocitos a partir de ratas Lewis hembra. Se anestésian los animales. Primero se perfundirá el hígado a través de la vena porta *in situ* con una solución amortiguadora de perfusión. Se equilibrará la solución de perfusión antes de ingresar al hígado. Subsiguientemente se perfundirá el hígado con colagenasa en la solución amortiguadora de perfusión. Luego se disectará y se transferirá el hígado a solución amortiguadora de perfusión enfriada en hielo. Se apartará la cápsula hepática, y se filtrará la suspensión de células resultante. Se recolectará el pélet de células por centrifugación y se resuspenderá. Se agregará Percoll a la suspensión, y se separarán los hepatocitos usando una técnica de centrifugación en densidad de Percoll. Se centrifugará la mezcla y se lavará dos veces el pélet de células con medio. Se determinará la viabilidad de los hepatocitos por exclusión de azul de Tripán. Como alternativa, se pueden usar hepatocitos criopreservados en lugar de los hepatocitos recién aislados.

Cultivo en sándwich de hepatocitos

Los hepatocitos aislados se cultivarán en placas de cultivo tisular recubiertas con colágeno y se mantendrán con medio de cultivo suplementado con suero, penicilina, estreptomycin, factor de crecimiento epidérmico, insulina, glucagón e hidrocortisona. Se preparará una solución de gelificación de colágeno mediante el mezclado de la solución de colágeno de Tipo I con medio de cultivo. Se recubrirán las placas de cultivo tisular con la solución de

gelificación y se incubarán a 37°C para promover la formación del gel. Se sembrarán los hepatocitos a una densidad apropiada y se mantendrán a 37°C. Se reemplazará el medio de cultivo cada 24 horas.

Para el sistema en sándwich, se distribuirá una solución adicional de gel de colágeno sobre las células después de 1 día de cultivo. Se separará cuidadosamente el medio de cultivo para asegurarse que la segunda capa de gel de colágeno está homogéneamente distribuida sobre toda la placa. Se incubarán las placas de cultivo a 37°C para permitir la formación del gel y la unión de la segunda capa de gel antes del reemplazo del medio. Se cambiará el medio de cultivo en forma diaria. Se almacenarán las muestras de medio a - 20°C para su posterior análisis.

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

Optimización de la formación de la red de canalículos biliares

Para optimizar la acumulación de taurocolato y la excreción de la bilis, se pueden usar medios de cultivo particulares tales como el medio E de Williams y el medio de Eagle modificado por Dulbecco en el cultivo en sándwich de hepatocitos.

Artículos de Prueba

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

Los agonistas de PPAR-alfa usados para el estudio incluyen a uno o más de clofibrato, gemfibrozil, ciprofibrato, bezafibrato, y fenofibrato.

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

Un agonista de PPAR δ (delta) usado para el estudio es el GW501516.

10 Las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) usadas en el estudio incluyen a atorvastatina (Lipitor), rosuvastatina (Crestor) y simvastatina (Zocor).

Ejemplo 5: Evaluación de los Efectos de la Administración Individual de los Artículos de Prueba sobre los Perfiles Lipídicos

15

Se evaluará el potencial de los 5 artículos de prueba, un agonista de FXR, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa/delta (o como alternativa, un agonista de PPAR-alfa y un agonista de PPAR-delta juntos), y una estatina para determinar su capacidad para alterar la síntesis de colesterol y el perfil lipídico en hepatocitos humanos. Se evaluarán los cambios en los hepatocitos humanos cultivados en sándwich (SCHH) después de 72 horas de exposición a los artículos de prueba a 3 diferentes concentraciones. Las soluciones de dosificación se prepararán nuevas cada día en medio de cultivo y la dosificación de los SCHH se hará en forma diaria durante 3 días. El experimento se llevará a cabo en formato de 24 pocillos usando un (1) lote de Hepatocitos Humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se llevará a cabo en tres (3) pocillos para

20

25

30

proporcionar datos por triplicado (expresados como la media $\pm$ desviación estándar). Se usarán placas tratadas con control de solvente como control y se evaluarán para ver la función basal. Al final del periodo de prueba, se agregará un estándar interno a los pocillos individuales, seguido por el agregado del reactivo de extracción para el perfilamiento lipídico global. Las muestras se agitarán durante 1 hora a temperatura ambiente, y se centrifugarán. Se evaporará el sobrenadante hasta sequedad bajo nitrógeno, se resuspenderá y se analizará.

El perfilamiento lipídico global se llevará a cabo usando Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento (UPLC) y MS de alta resolución. Los extractos de las muestras metil-t-butiladas se analizarán en un instrumento UPLC-MS (Synapt G2 Ion-Mobility QToF), en modo ESI+ y ESI-, para cubrir un amplio rango de polaridad de lípidos y composiciones químicas. Inicialmente, se aplicará la UPLC para evaluar los efectos de los compuestos en una matriz grande (entre 5000 y 8000) de lípidos, incluyendo múltiples ésteres de colesterol. Se llevará a cabo un análisis colorimétrico para medir el colesterol total. En base a la abundancia, la mayoría serán glicerofosfolípidos, sin embargo, se evaluará un gran número de clases. Se evaluarán los perfiles para identificar efectos potenciales sobre los lípidos individuales. La identificación de las especies lipídicas se hará en comparación con estándares usando el tiempo de retención del ensayo, su masa y fragmentación precisa. Dependiendo del resultado, se pueden identificar lípidos o clases de lípidos específicos para su evaluación en los Ejemplos 6 y 7. Se repetirá un estudio confirmatorio

en dos lotes adicionales de Hepatocitos Humanos Transporter Certified™ (N=2).

Ejemplo 6: Evaluación de los Efectos de Combinaciones
5 Duales de los Artículos de Prueba sobre los Perfiles
Lipídicos

Se evaluarán combinaciones de agonista de FXR, con
cada uno de un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-
delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta (o, en como
10 alternativa, un agonista de FXR con un agonista de PPAR
alfa y un agonista de PPAR delta), y/o una estatina para
estudiar su potencial para alterar la síntesis de
colesterol y el perfil lipídico en hepatocitos humanos. Las
combinaciones específicas evaluadas serán:

- 15 • Agonista de FXR con agonista de PPAR-alfa
- Agonista de FXR con agonista de PPAR-delta
- Agonista de FXR con agonista dual de PPAR-alfa y
delta y/o agonista de FXR con agonista de PPAR-alfa y
agonista de PPAR-delta
- 20 • Agonista de FXR con una estatina

Se evaluarán los cambios en los hepatocitos humanos
cultivados en sándwich (SCHH) después de 72 horas de
exposición a los artículos de prueba a 3 diferentes
concentraciones. Las soluciones de dosificación se
25 prepararán nuevas cada día en medio de cultivo y la
dosificación de los SCHH se hará cada día durante 3 días.
El experimento se llevará a cabo en formato de 24 pocillos
usando un (1) lote de Hepatocitos Humanos Transporter
Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se llevará a
30 cabo en tres (3) pocillos para proporcionar datos por
triplicado (expresados como la media ± desviación estándar).

Las muestras se prepararán y se analizarán para estudiar el perfilamiento lipídico global como se detalla en el Ejemplo 5. Las alteraciones de los perfiles lipídicos y de la síntesis de colesterol se compararán con los efectos de la administración individual del Ejemplo 2.

Ejemplo 7: Evaluación de los Efectos de Combinaciones Triples de los Artículos de prueba sobre los Perfiles Lipídicos

Se evaluará la combinación triple de un agonista de FXR, un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-delta, un agonista dual de PPAR-alfa y delta (o un agonista de PPAR-alfa en combinación con un agonista de PPAR-delta), y/o una estatina para ver su potencial para alterar la síntesis de colesterol y el perfil lipídico en hepatocitos humanos. Se evaluarán los cambios en los hepatocitos humanos cultivados en sándwich (SCHH) después de 72 horas de exposición a los artículos de prueba a 3 diferentes concentraciones. Las soluciones de dosificación se prepararán nuevas cada día en medio de cultivo y la dosificación de los SCHH se hará cada día durante 3 días. El experimento se llevará a cabo en formato de 24 pocillos usando un (1) lote de Hepatocitos Humanos Transporter Certified™ (N=1). Cada condición de prueba se llevará a cabo en tres (3) pocillos para proporcionar datos por triplicado (expresados como la media $\pm$ desviación estándar).

Las muestras se prepararán y se analizarán para estudiar el perfilamiento lipídico global como se detalla en el Ejemplo 2. Las alteraciones de los perfiles lipídicos y de la síntesis de colesterol se compararán con los

efectos de las combinaciones administradas en el Ejemplo 2.

Las combinaciones específicas evaluadas serán:

- Agonista de FXR con un agonista de PPAR-alfa, y una estatina

- Agonista de FXR con un agonista de PPAR-delta, y una estatina

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

Las muestras se prepararán y se analizarán para estudiar el perfilamiento lipídico global como se detalla en el Ejemplo 4. Las alteraciones de los perfiles lipídicos y de la síntesis de colesterol se compararán con los efectos de las combinaciones que se administraron en los Ejemplos 4 y 5.

Ejemplo 8: Estudios en Animales

Animales

Los animales se alojarán individualmente en jaulas estándar a 22°C en un ciclo de 12:12 horas de luz y oscuridad. A los ratones C57BL/6 macho (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se les permitirá un acceso *ad libitum* a una dieta enriquecida en grasas (40% kcal, aceite vegetal sólido parcialmente hidrogenado Primex), fructosa (22% en peso), y colesterol (2% en peso) (Research Diets, New Brunswick, NJ, no. de cat. D09100301). Se usará una dieta con bajo contenido de grasas (10% kcal; de aquí en adelante definida como LFD) sin fructosa o colesterol, como dieta control (Research Diets, no. de cat. D09100304). El uso de esta LFD validada establece un grupo de ratones control que mantienen un fenotipo hepático "normal" para su

comparación con los animales alimentados con la dieta experimental.

Grupos de Tratamiento

- 5 HFD Control:
 LFD Control:
 HFD + agonista de FXR:
 HFD + PPAR α (es decir, fenofibrato, gemfibrozil, bezofibrato, o ciprofibrato):
10 HFD + PPAR δ (es decir, GW501516):
 HFD + PPAR α + PPAR δ
 HFD + PPAR α/δ dual (es decir, GFT505):
 HFD + estatina (es decir, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina)
15 HFD + agonista de FXR + PPAR α :
 HFD + agonista de FXR + PPAR δ :
 HFD + agonista de FXR + PPAR α + PPAR δ :
 HFD + agonista de FXR + PPAR α/δ dual:
 HFD + agonista de FXR + estatina:

20 *Histología y análisis de imágenes digitales*

- Al momento del sacrificio, se extraerán el lóbulo derecho medio y/o el lóbulo lateral izquierdo del hígado (>50% de cada lóbulo extraído) y se fijarán en formalina amortiguada a pH neutro al 10% (por lo menos 7 días a temperatura ambiente). El tejido recolectado se cortará
25 cuidadosamente para seleccionar secciones de tamaño similar representativas tanto del borde como del centro del tejido. El tejido hepático de embeberá en parafina, se seccionará (5 μ m), y se montará. Se usarán tinciones de hematoxilina y eosina para los análisis morfológicos, y las tinciones
30 tricrómica de Masson y con rojo Sirius para la evaluación

de la fibrosis hepática. El análisis histopatológico se llevará a cabo por un patólogo a ciegas para su estudio. La NAFLD y la NASH se puntuarán mediante el uso de los criterios descritos por Kleiner y colegas. Para la evaluación cuantitativa de la fibrosis, se escanearán las secciones completas teñidas con rojo Sirius mediante el uso del sistema de barrido de portaobjetos completos ScanScope CS (Aperio, Vista, CA) con una magnificación de x20. Se extraerán las imágenes y se medirán los perfiles de colágeno teñido con rojo Sirius de todo el tejido mediante el método basado en el cubo de colores con el programa de computadoras Image-Pro Analyzer (MediaCybernetics v.6.2, Bethesda, MD). La tinción del colágeno total (informado como % del área total) se evaluará a partir de tres a cuatro secciones representativas de cada animal (excepto para el experimento de evaluación integral de la fibrosis hepática en donde se evaluarán secciones adicionales). Todos los análisis histológicos se llevarán a cabo en forma cegada.

Biopsia de hígado

Se anestesiarán los ratones con isoflurano (2-3%) en 100% de oxígeno. Se hará una pequeña incisión abdominal, ~0.5 cm a la izquierda de la línea media, y se expondrá el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Se extraerá una cuña de tejido hepático (~50 mg) a partir de la parte distal del lóbulo, se colocará inmediatamente en un vial, y se congelará en forma rápida en nitrógeno líquido. Se insertará una cuña de esponja de gelatina absorbible (GelFoam, Pfizer, NY) en los bordes cortados del hígado. Una vez que se consigue la hemostasis (típicamente en menos

de 1 min) y que la esponja de gelatina se adhirió bien al sitio de la biopsia, se retornará el hígado a la cavidad abdominal, se suturará la pared abdominal, y se colocarán grampas en la piel. Los ratones recibirán una inyección individual de buprenorfina (0.05 mg/kg, subcutánea) al momento de la cirugía para controlar el dolor postoperatorio. Los ratones con operación de control se someterán a un procedimiento idéntico excepto que no se hará una incisión en el hígado.

Análisis de plasma y suero

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

Cuantificación de contenido de lípidos hepáticos totales y colágeno

Se extraerán los lípidos hepáticos totales del hígado usando un protocolo adaptado de Folch y col. Se homogeneizará el tejido hepático congelado (~0.3 g) en 10 ml de solución 2:1 de cloroformo-metanol. Se filtrará el homogenato usando papel de filtro libre de grasas y se trasvasará a un vial de vidrio de 15 ml previamente pesado. Se agregarán 5 ml adicionales de cloroformo-metanol 2:1

seguido por 2.5 ml de NaCl al 0.9%. Se separarán los lípidos por centrifugación a 1,800 g, 10°C durante 5 min, se descartará la fase acuosa, y se gaseará el tubo con nitrógeno hasta el que pélet de lípidos esté seco. Se pesará nuevamente el tubo que contiene los lípidos y se calcularán los lípidos totales extraídos por gramo de hígado total. El contenido de colágeno total en el hígado se medirá mediante una determinación colorimétrica de los residuos de hidroxiprolina a través de la hidrólisis ácida del colágeno (Quickzyme, Leiden, Países Bajos).

Determinación de la proteína colágeno-1 α 1 extraíble por inmunotransferencia

Se recolectarán núcleos tisulares (entre 50 y 100 mg) a partir del lóbulo lateral izquierdo del hígado, se congelarán rápidamente en nitrógeno líquido, y se almacenarán a -80°C hasta su procesamiento. Se homogeneizará el tejido en solución amortiguadora de lisis que contiene inhibidores de proteasa. Se medirá la concentración de proteínas del sobrenadante limpio con un kit para ensayo de proteínas con BCA (Pierce, Rockford, IL). Se separarán los lisados de tejido hepático (~50 μ g) en geles reductores Nupage 4-12% (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se transferirán a membranas de nitrocelulosa. Se cortarán las membranas entre los marcadores de 50 y 60 kDa y se bloquearán con 5% de Blotto. A la mitad superior se le agregará anti-colágeno-1 α 1 (1:1,000; no. de cat. NBP1-30054; Novus Biologicals, Littleton, CO), que detecta la porción telopeptídica COOH terminal de la proteína de colágeno-1 α 1. Para su normalización, se agregará a la mitad inferior anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:7500;

no. de cat. 3683; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA). Después de la incubación con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante, se detectará la expresión de la proteína con quimioluminiscencia potenciada (Thermo Scientific, Rockford, IL), y se llevará a cabo una densitometría con un FluorChem System (Cell Biosciences, Santa Clara, CA). El análisis densitométrico del colágeno 1 α 1 incluirá tanto la proteína madura de 140 kDa así como también una banda levemente más grande, que corresponde a la forma glicosilada o a una proteína de colágeno-1 α 1 parcialmente procesada.

Cambios de expresión de genes de hígado

Se recolectarán muestras de tejido del lóbulo lateral izquierdo del hígado con una herramienta de corte de tejido de 6 mm o mediante el método de biopsia, se congelarán rápidamente en nitrógeno líquido, y se almacenarán a -80°C hasta su procesamiento. Se extraerá el ARN total de las muestras de hígado (~50-150 mg) mediante el uso del TRI Reagent (Life Technologies) y luego se purificarán con el kit Qiagen RNeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia, CA). La integridad del ARN se determinará usando el kit Agilent 6000 nano en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se preparará el ADNc mediante el uso del High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Los cambios de expresión génica se confirmarán por ensayos específicos de expresión génica por TagMan y con la Universal Master Mix (Life Technologies) en un instrumento ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). El cambio en la expresión génica se calculará mediante el método de comparación de ciclo umbral (CT) con

el uso de peptidilprolil isomerasa A (*Ppia*) y *Gapdh* para la normalización. Para las matrices de genes, se correrán las muestras de ADNc en los Mouse Fibrosis RT2 Profiler PCR Arrays (PAMM120C, RT2 SYBR Green/ROX gPCR Master Mix; SABiosciences) mediante el uso del ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los cambios de expresión génica en la matriz se calcularán mediante el método de comparación de CT usando el programa de computadora DataAssist v3.0 (Applied Biosystems/Life Technologies). Entre los cinco genes estándares internos incluidos en el Mouse Fibrosis RT2 Profiler PCR Array, la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*Hprt*) y la *Gapdh* tienen la expresión más estable de acuerdo a las puntuaciones de estabilidad calculadas con el programa de computadora DataAssist v3.0. Se usará la media de los genes control endógenos seleccionados como factor de normalización para calcular la expresión relativa de cada gen. Para confirmar los resultados obtenidos mediante el uso de la matriz para fibrosis, se llevarán a cabo ensayos de expresión génica por TagMan para una selección de los genes determinados por la matriz como con expresión aumentada, disminuida, o sin alterar.

Ejemplo 9: Ensayo clínico

Se llevó a cabo un ensayo clínico multicéntrico, a doble ciego, controlado por placebo, de grupos paralelos, randomizado en pacientes con esteatohepatitis no cirrótica, no alcohólica para evaluar el tratamiento con ácido obeticólico dado oralmente (25 mg por día) o con placebo durante 72 semanas. Los pacientes se asignaron en forma

5 aleatoria 1:1 usando un procedimiento generado por computadora administrado centralmente, estratificados por centro clínico y estado de diabetes. La medida de valoración final primaria fue la mejora de la puntuación central de histología de hígado definida como una
10 disminución de la actividad de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en por lo menos 2 puntos, sin empeoramiento de la fibrosis respecto al estado basal al final del tratamiento. Se midió el cambio de la alanina aminotransferasa a las 24 semanas: cambio relativo de alanina aminotransferasa -24%, 95% de CI entre -45 y -3.

Diseño del estudio y participantes

15 Los pacientes se enrolaron en el estudio de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: 18 años de edad o mayores al momento del cribado, evidencia histológica de esteatohepatitis no alcohólica definida o límite, en base a una biopsia de hígado obtenida 90 días o menos antes de la randomización, y una puntuación histológica de actividad de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) de 4 o más
20 con una puntuación de 1 o más en cada componente de la puntuación (puntuación de esteatosis entre 0 y 3, formación de englobamientos entre 0 y 2, e inflamación lobular entre 0 y 3). La calificación en grados y etapas de las biopsias para los propósitos del enrolamiento se llevaron a cabo en
25 el sitio del enrolamiento. Los criterios de exclusión incluyen la presencia de cirrosis, otras causas de enfermedad hepática, consumo sustancial de alcohol (>20 g/día para mujeres o >30 g/día para hombres), u otras
30 condiciones que produzcan interferencias (véase más adelante).

Randomización y enmascaramiento

Los pacientes que cumplieron con los criterios de elegibilidad se asignaron en forma aleatoria (1:1) a ácido obeticólico oral, 25 mg una vez por día, o placebo. El
5 ácido obeticólico y el placebo se proveyeron en comprimidos idénticos en contenedores idénticos marcados con números codificados. Los pacientes, investigadores, miembros del sitio clínico y patólogos desconocen la asignación a los
10 distintos tratamientos.

Procedimientos

Después de la randomización, los pacientes retornaron para las visitas de estudio a las semanas 2, 4, y 12, y luego cada 12 semanas hasta el final del tratamiento en la
15 semana 72, y luego 24 semanas más tarde. Se obtuvieron muestras de sangre en estas visitas para las pruebas bioquímicas de rutina y para la evaluación de las concentraciones en ayunas de lípidos, glucosa, e insulina. Se midieron el peso corporal, la altura, y circunferencias
20 de cintura y cadera en la evaluación inicial y en los puntos de tiempo intermedios designados. Todos los pacientes recibieron recomendaciones estándares sobre hábitos de alimentación saludable, reducción de peso, ejercicio, y sobre el manejo de la hipertensión,
25 hipercolesterolemia y diabetes, en los casos indicados.

Se evaluaron en forma central las biopsias de hígado de estado basal y del final de tratamiento en forma grupal para las puntuaciones de consenso para cada componente de la puntuación de actividad de NAFLD, se determinó la etapa
30 de fibrosis, y se asignó un diagnóstico de esteatohepatitis

no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica límite, o de no esteatohepatitis no alcohólica.

Criterios de inclusión exclusión

5 Los pacientes que cumplieron con cualquiera de los siguientes criterios de exclusión se consideraron como no elegibles para el enrolamiento: 1) consumo de alcohol significativo actual o histórico durante un periodo de más de 3 meses consecutivos dentro del año previo al cribado
10 (el consumo de alcohol significativo se definió como más de 20 g/día en mujeres y más de 30 g/día en hombres, en promedio); 2) incapacidad para cuantificar el consumo de alcohol en forma confiable en base al juico de los investigadores del sitio; 3) uso de fármacos históricamente
15 asociados con NAFLD por más de 2 semanas en el año previo a la randomización; 4) cirugía o procedimiento bariátrico previo o planeado; 5) diabetes no controlada definida como una HbA1c de 80.3 mmol/mol o mayor dentro de los 60 días previos al enrolamiento; 6) presencia de cirrosis en la
20 biopsia de hígado, 7) conteo de plaquetas $<100 \times 10^9/L$; 8) evidencia clínica de descompensación hepática definida por la presencia de cualquiera de las siguientes anormalidades: albúmina en suero menor que 32 g/L, INR mayor a 1.3, bilirrubina directa mayor que 22.2 $\mu\text{mol/L}$, o una historia
25 de várices esofágicas, ascitos, o encefalopatía hepática; 9) evidencia de otras formas de enfermedad hepática crónica: hepatitis B definida por la presencia de antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), hepatitis C definida por la presencia de ARN de virus de hepatitis C (HCV) o
30 positividad para anticuerpo anti-hepatitis C (anti-HCV), evidencia de enfermedad hepática autoinmune actual definida

por una histología compatible de hígado, cirrosis biliar primaria definida por la presencia de por lo menos 2 criterios (evidencia bioquímica de colestasis basada principalmente en la elevación de la fosfatasa alcalina, presencia de anticuerpos anti-mitocondriales [AMA], y evidencia histológica de colangitis destructiva no supurativa y destrucción de ductos biliares interlobulARES), colangitis esclerosante primaria, enfermedad de Wilson definida por un nivel de ceruloplasmina por debajo de los límites normales e histología hepática compatible, deficiencia de alfa-1-antitripsina (A1AT) definida por características diagnósticas de histología hepática (confirmada por un nivel de alfa-1-antitripsina menor de lo normal, exclusión según la discreción del investigador del sitio), historia de hemocromatosis o sobrecarga de hierro definida por la presencia de tinción de hierro 3+ o 4+ en la biopsia de hígado, enfermedad de hígado inducida por fármacos definida en base a exposición típica e historia, obstrucción conocida de ductos biliares, cáncer de hígado sospechado o demostrado, o cualquier otro tipo de enfermedad hepática distinta a NASH; 10) alanina aminotransferasa (ALT) sérica mayor que 300 U/L; 11) creatinina sérica de 176.8 µmol/L o mayor; 12) incapacidad para obtener una biopsia de hígado en forma segura; 13) historia de desvío biliar; 14) positividad conocida para infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); 15) enfermedad médica seria activa con probabilidad de esperanza de vida menor a 5 años; 16) abuso activo de sustancias incluyendo fármacos por inhalación o inyección en el año previo al cribado; 17) embarazo, embarazo

planeado, potencial para embarazo y renuencia al uso de un control eficaz de la natalidad durante el ensayo, o amamantamiento; 18) participación en un ensayo IND en los 30 días previos a la randomización; 19) cualquier otra condición que, en la opinión del investigador del sitio, impida el cumplimiento o que entorpezca la finalización del estudio; o 20) falla para dar un consentimiento informado.

Análisis estadístico

Se analizaron el punto de valoración final primario y los puntos de valoración final secundarios binarios usando la prueba de Mantel-Haenszel; se analizaron los puntos finales de valoración secundarios continuos usando modelos de ANCOVA que relacionan el cambio en el punto de valoración final continuo respecto al estado basal a las 72 semanas con el grupo de tratamiento y con el valor basal para el punto de valoración final. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el SAS (SAS Institute 2011, Base SAS 9.3 Procedures Guide) y el Stata (StataCorp 2013, Stata Statistical Software: versión13).

Puntos de valoración final

La medida de punto de valoración final primaria fue la mejoría de la puntuación central de histología definida como una disminución de la puntuación de actividad de NAFLD de por lo menos 2 puntos sin empeoramiento de la fibrosis respecto al estado basal, al final del tratamiento. El empeoramiento de la fibrosis se definió como cualquier incremento numérico de la etapa. Los puntos de valoración final histológicos secundarios incluyeron incluyen la resolución de la esteatohepatitis no alcohólica, el cambio de la puntuación de actividad de NAFLD, y cambios en las

puntuaciones individuales para formación de englobamientos hepatocelulares, esteatosis, inflamación lobular y portal, y fibrosis. La mejora en la fibrosis se definió como cualquier disminución numérica de la etapa. Las etapas de fibrosis 1a, 1b y 1c se consideraron como etapa 1 para los propósitos del análisis. Otros puntos de valoración final secundarios incluyeron cambios respecto al estado basal a las 72 semanas en las concentraciones de aminotransferasas séricas y de gamma-glutamyl transpeptidasa, el modelo de evaluación de resistencia a la insulina de homeostasis en ayunas (HOMA-IR), medidas antropométricas (peso, índice de biomasa, proporción de cintura a cadera, circunferencia de cintura), y puntuaciones de calidad de vida relacionadas con la salud.

Ejemplo 10: Análisis de los datos

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

- El Grupo A (n=64, sin estatina) incluyó a los sujetos en la rama de tratamiento con ácido obeticólico (OCA) que no consumían estatina en estado basal (Día 0) y que no iniciaron consumo de estatina a lo largo del curso del estudio hasta la Semana 72, inclusive.

•El Grupo B (n=47, estatina basal) incluyó a los sujetos de la rama de tratamiento con el OCA que consumían estatina en estado basal y que continuaron consumiendo estatina durante el estudio hasta la semana 72, inclusive.

•El Grupo C (n=23, nuevos con estatina) incluyó a los sujetos de la rama de tratamiento con el OCA que no consumían estatina en estado basal pero que iniciaron un tratamiento con estatina en un momento posterior al estado basal, hasta la semana 72, inclusive.

Se llevaron a cabo los siguientes cálculos para los sujetos tratados con OCA en los Grupos A, B, y C.

•Se evaluarán la media y la mediana de las características que se enumeran más adelante en estado basal y en la semana 72.

◦ Valores de laboratorio: LDL-C, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), alanina y aspartato aminotransferasa, gamma glutamil transferasa

◦ Edad

◦ Género: porcentaje de hombres, porcentaje de mujeres

◦ Porcentaje de diabéticos

◦ Histología: esteatosis, englobamientos, inflamación, fibrosis

• Se evaluarán la media y la mediana del cambio porcentual a la semana 72 respecto al estado basal para las características anteriores.

Resultados

El colesterol LDL se incrementó durante el tratamiento con el OCA en los pacientes con estatinas en estado basal, pero los niveles no superaron a los de los pacientes tratados con placebo que no consumieron estatinas. El inicio del tratamiento con estatinas durante el tratamiento con el OCA revirtió los niveles de LDL por debajo de los niveles basales previos al tratamiento con el OCA. Como se muestra en la Figura 8, el incremento de LDL relacionado al OCA pareció revertirse mediante el inicio de la terapia con estatinas durante el tratamiento con el OCA.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.