

TRATAMIENTO DE TRASTORNOS HEPÁTICOS CON UN AGONISTA DEL THR- β

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de PCT/CN2021/130083, presentada el 11 de noviembre de 2021, y PCT/CN2022/097426 presentada el 7 de junio de 2022. El contenido de las solicitudes de patente antemencionadas se incorpora al presente mediante esta referencia en su totalidad para todos los fines.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] Esta invención se refiere a métodos y composiciones para tratar un trastorno hepático en un paciente.

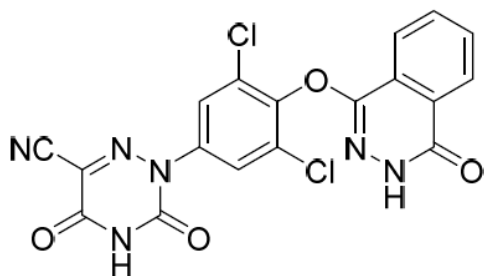
ANTECEDENTES

[0003] La esteatosis hepática (FLD) abarca un espectro de estados patológicos caracterizados por una acumulación excesiva de grasa en el hígado, a menudo acompañada de inflamación. La FLD puede provocar la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), que puede caracterizarse por resistencia a la insulina. Si no se trata, la NAFLD puede progresar a una respuesta inflamatoria persistente o esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis hepática progresiva y, finalmente, a cirrosis. En Europa y Estados Unidos, la NAFLD es el segundo motivo más común de trasplante de hígado. En consecuencia, la necesidad de tratamiento es urgente, pero debido a la falta de síntomas evidentes para el paciente, los pacientes pueden carecer de motivación para mantener regímenes de tratamiento, particularmente regímenes de tratamiento onerosos, tales como medicamentos inyectados, medicamentos que se administran muchas veces al día o cualquiera que produzca efectos secundarios peligrosos o irritantes. Actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para NASH.

[0004] Recientemente, se han investigado los agonistas del receptor beta de la hormona tiroidea (THR- β) en el tratamiento de enfermedades hepáticas, incluida NASH. El THR- β es la forma principal de THR en el hígado y desempeña una función clave en el equilibrio energético y el metabolismo de los ácidos grasos y lípidos, mientras que THR- α predomina en el corazón y es responsable de la mayoría de los efectos cardiovasculares no deseados de la estimulación hormonal tiroidea. Un problema importante a superar implica el desarrollo de un agonista de THR- β para tratar NASH que no produzca efectos secundarios indeseables asociados con el agonismo de THR- α .

BREVE COMPENDIO

[0005] En el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para tratar un trastorno hepático en un paciente que lo necesita. Los métodos comprenden administrar al paciente el agonista del receptor beta de la hormona tiroidea (THR- β), al que se hace referencia en el presente documento como Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.



Compuesto 1

El compuesto 1, que tiene el nombre químico 2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxi)fenil)-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazina-6-nitrilo, se describió en la patente estadounidense número 11 084 802, que se incorpora aquí mediante esta referencia en su totalidad.

[0006] Los inventores han descubierto que el Compuesto 1, o una forma farmacéuticamente aceptable de este, se puede administrar a pacientes que padecen trastornos hepáticos en dosis sorprendentemente bajas al tiempo que se mantiene el nivel deseado de eficacia. Como resultado, el Compuesto 1 puede usarse para tratar trastornos hepáticos sin los efectos secundarios indeseables generalmente asociados con el agonismo de THR.

[0007] En algunas modalidades de la divulgación, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se puede administrar a pacientes por vía oral una vez al día en dosis tan bajas como de 1 mg o menos e incluso así reducir suficientemente la actividad de la amina oxidasa y reducir la adhesión y trans migración de los linfocitos. Por ejemplo, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se puede administrar por vía oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (por ejemplo, NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 60 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 25 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 15 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 3 mg a alrededor de 10 mg. En algunas modalidades, se

5 puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

10 trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 3 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 4 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

15 trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 5 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 6 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

20 trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 10 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 15 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

25 trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 20 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 30 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un

30 trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 50 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de

alrededor de 60 mg.

[0008] En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir NASH en un paciente que lo necesita, dicho método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una modalidad, el paciente que lo necesita es un paciente que padece de esteatosis hepática, como NAFLD. En otra modalidad, el paciente que lo necesita es un paciente que padece de síndrome metabólico.

[0009] En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para reducir la inflamación hepática en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. La reducción de la inflamación hepática se caracteriza por una expresión reducida de genes inflamatorios y marcadores de activación de leucocitos en el hígado. En algunas modalidades, la inflamación hepática se reduce sin aumentar los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en la sangre del paciente.

[0010] En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad o afección caracterizada por fibrosis del hígado, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. La reducción de la fibrosis se caracteriza por una mejora histológica y una expresión reducida de genes profibróticos en el hígado. En algunas modalidades, se reduce la fibrosis hepática sin aumentar el nivel de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en sangre del paciente. En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, tiene como consecuencia la reducción de la fibrosis hepática y la inflamación hepática.

[0011] En algunas modalidades, el paciente tiene un trastorno hepático y diabetes mellitus. En algunas modalidades, el paciente tiene un trastorno hepático y un trastorno cardiovascular. En algunas modalidades, el período de tratamiento es el tiempo de vida restante del paciente. En algunas modalidades, el método no comprende administrar un antihistamínico, un inmunosupresor, un esteroide, rifampicina, un antagonista opioide o un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS).

[0012] En algunas modalidades, el Compuesto 1 se administra al paciente como una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es

una sal de potasio. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.

[0013] La divulgación también proporciona nuevas composiciones que comprenden el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El compuesto 1 tiene una solubilidad acuosa muy baja, incluso cuando se administra en forma de sal. Se ha descubierto que tensioactivos iónicos particulares pueden solubilizar eficazmente el Compuesto 1, y sus sales farmacéuticas, con una degradación mínima o nula del compuesto. En algunas modalidades, el tensioactivo iónico es laurilsulfato de sodio. En algunas de estas modalidades, la cantidad de SLS en la composición es de alrededor del 1 % a alrededor del 8 % en peso. En otras modalidades similares, la cantidad de SLS en la composición es de alrededor del 5 % en peso. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende la sal de potasio del Compuesto 1 y SLS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0014] En la FIG. 1 se muestra la concentración plasmática del compuesto 1 en pacientes hasta 72 horas después de la administración de una dosis única del compuesto 1.

[0015] En la FIG. 2 se muestran el área bajo la curva (AUC_{inf}) y la concentración plasmática máxima ($C_{máx}$) del compuesto 1 en pacientes representadas frente a la dosis administrada.

[0016] En la FIG. 3 se muestra el cambio porcentual medio en la globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) 4 días después de la administración de una dosis única del compuesto 1.

[0017] En la FIG. 4 se muestra el cambio porcentual medio en la apolipoproteína B (Apo B) 4 días después de la administración de una dosis única del compuesto 1.

[0018] En la FIG. 5 se muestran T3, T4 y TSH libres el día 15 después de 14 días de administración diaria del compuesto 1 o placebo en humanos.

[0019] En la FIG. 6 se muestra el cambio porcentual en la testosterona libre, la testosterona total y la globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) con respecto al valor basal el día 15 después de 14 días de administración diaria del compuesto 1 o placebo en humanos.

[0020] En la FIG. 7 se muestran las concentraciones plasmáticas del Compuesto 1 a lo largo del tiempo en los días 1 y 14 de un estudio de dosis múltiples ascendentes en el que se administraron dosis del Compuesto 1 una vez al día.

[0021] En la FIG. 8 se muestra el cambio porcentual en los marcadores farmacodinámicos (globulina de fijación de hormonas sexuales, ApoB, colesterol total, LDL-c, HDL-c y triglicéridos) con respecto al valor basal el día 15 después de 14 días de administración diaria del compuesto 1 o placebo en humanos.

5 **[0022]** En la FIG. 9 se muestran los efectos del Compuesto 1 sobre el peso corporal y de órganos en un modelo de NASH de ratón.

[0023] En la FIG. 10 se muestran los efectos del Compuesto 1 sobre la esteatosis, inflamación y fibrosis del hígado en un modelo de NASH de ratón.

10 **[0024]** En la FIG. 11 se muestran los efectos del Compuesto 1 sobre los lípidos y los indicadores de lesión hepática (ALT) en el modelo de NASH de ratón.

[0025] En la FIG. 12 se muestran los efectos del Compuesto 1 sobre la expresión de genes asociados con la matriz extracelular de colágeno y la activación de las células estrelladas hepáticas.

15 **[0026]** En la FIG. 13 se muestra la concentración plasmática del compuesto 1 en perros beagle después de la administración de una dosis única de 50 mg proporcionada en una de dos formulaciones orales (PO1 o PO2).

20 **[0027]** En la FIG. 14 se muestra la concentración en plasma del compuesto 1 en dos grupos de perros beagle después de la administración de una dosis única de 10 mg proporcionada en la formulación oral PO3. Un grupo fue tratado previamente con pentagastrina, mientras que el otro grupo fue tratado previamente con famotidina.

[0028] En la FIG. 15 se muestra la concentración en plasma del compuesto 1 en perros beagle en ayunas y alimentados después de la administración de una dosis única de 10 mg proporcionada en la formulación oral PO3.

25 **[0029]** En la FIG. 16 se muestra el espectro de XRPD del compuesto 1, forma de sal de potasio, tipo A.

[0030] En la FIG. 17 se muestra el espectro de XRPD del compuesto 1, forma de ácido libre, tipo A.

[0031] En la FIG. 18 se muestra el espectro de XRPD del compuesto 1, forma de sal de sodio, tipo A.

30 **[0032]** En la FIG. 19 se muestra el espectro de XRPD del compuesto 1, forma de sal de L-arginina, tipo A.

[0033] En la FIG. 20 se muestra el espectro de XRPD del compuesto 1, forma de sal de magnesio, tipo A.

[0034] En la FIG. 21 se muestra el diseño general del estudio para el compuesto 1.

[0035] En la FIG. 22 se muestran los datos demográficos y las características basales del compuesto 1.

[0036] En la FIG. 23 se muestra el perfil de concentración plasmática en función de tiempo, día 14, para el compuesto 1.

[0037] En la FIG. 24 se muestran los parámetros PK del día 14 del compuesto 1.

[0038] En la FIG. 25 se muestra la globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) (cambio porcentual con respecto al valor basal hasta el día 15).

[0039] En la FIG. 26 se muestra el LDL-c (cambio porcentual con respecto al valor basal hasta el día 15).

[0040] En la FIG. 27 se muestra el cambio porcentual con respecto al valor basal al final del tratamiento (Día 15) para SHBG y LDL-c por dosis del compuesto 1.

[0041] En la FIG. 28 se muestran las disminuciones en el colesterol total (CT), Apo B y triglicéridos (TG) por dosis del compuesto 1.

[0042] En la FIG. 29 se muestra que los eventos adversos que surgieron del tratamiento fueron leves y en su mayoría no relacionados, sin cambios significativos en los signos vitales.

[0043] En la FIG. 30A y FIG. 30B se muestra el cambio de peso corporal en ratones DIO-NASH macho confirmados por biopsia. El compuesto 2 solo y en combinación con el compuesto 1 redujo el peso corporal. Los pesos corporales se midieron diariamente durante el estudio. El cambio de peso corporal durante el estudio se muestra en la FIG. 30A, donde los puntos representan el cambio medio de peso corporal con respecto al valor basal (n = 10 a 16 ratones por grupo). En la FIG. 30B, las barras representan el peso corporal medio (SD) medido en la Semana 11 del estudio. Control no graso del vehículo, blanco; control de vehículo DIO-GAN, gris; Compuesto 2, azul; Compuesto 1 bajo, naranja claro; Compuesto 1 medio, naranja; Compuesto 1 elevado, naranja oscuro; Combo bajo, violeta claro; Combo medio, morado; Combo elevado, violeta oscuro. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0044] En la FIG. 31 se muestra la ingesta semanal discreta de alimentos durante el estudio.

Los puntos representan la ingesta media semanal de alimentos en gramos (n = 10 a 16 ratones por grupo). Control no graso del vehículo, blanco; control de vehículo DIO-GAN, gris; Compuesto 2, azul; Compuesto 1 bajo, naranja claro; Compuesto 1 medio, naranja; Compuesto 1 elevado, naranja oscuro; Combo bajo, violeta claro; Combo medio, morado; Combo elevado, violeta oscuro.

[0045] En la FIG. 32A y FIG. 32B se muestra el peso del hígado y del bazo. El Compuesto 2 y el Compuesto 1 solos y en combinación redujeron significativamente la hepatomegalia sin cambios en el peso del bazo. Las barras representan los pesos medios (SD) de los órganos hígado (FIG. 32A) y bazo (FIG. 32B) (n = 10 a 16 ratones por grupo) determinados al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0046] En la FIG. 33A y FIG. 33B se muestra la composición de la masa corporal al inicio. La composición de la masa corporal estuvo bien equilibrada en todos los grupos de tratamiento al inicio del estudio (semana -1). Las barras representan la masa media (SD) de tejido graso (FIG. 33A) y tejido no graso (FIG. 33B) como porcentaje del peso corporal (% BW, n = 10 a 16 ratones por grupo) determinado por EchoMRI de cuerpo entero en la Semana -1 del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0047] En la FIG. 34A y FIG. 34B se muestra la composición de masa corporal en la semana 11. El compuesto 2 solo y en combinación con el compuesto 1 redujo significativamente la masa de tejido graso. Las barras representan el promedio (SD) de masa de tejido graso (FIG. 34A) y tejido no graso (FIG. 34B) como un porcentaje de peso corporal (%BW, n=10-16 ratones por grupo) determinado mediante EchoMRI de cuerpo entero en la semana 11 del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0048] En la FIG. 35A y FIG. 35B se muestra el colesterol total en plasma e hígado. El Compuesto 2 y el Compuesto 1 solos y en combinación redujeron significativamente el colesterol total. Las barras representan los niveles medios (SD) de colesterol total medidos al

final del estudio (n=10 a 16 ratones por grupo) en plasma (FIG. 35A) e hígado (FIG. 35B). Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

5 **[0049]** En la FIG. 36A y FIG. 36B se muestran triglicéridos en plasma e hígado. El compuesto 2 solo y en combinación con el compuesto 1 redujo significativamente los triglicéridos en plasma. Las barras representan el promedio (SD) de los niveles de triglicéridos medidos al final del estudio (n=10-16 ratones por grupo) en plasma (FIG. 36A) e hígado (FIG. 36B). Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA
10 seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0050] En la FIG. 37A y la FIG. 37B se muestran los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). El compuesto 1 solo redujo significativamente los niveles de alanina aminotransferasa (ALT). Las barras representan los niveles medios (SD) de
15 ALT (FIG. 37A) y aspartato aminotransferasa (AST) (FIG. 37B) (n = 10 a 16 ratones por grupo) determinados al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

[0051] En la FIG. 38 se muestran los niveles de fosfatasa alcalina. Los niveles de fosfatasa
20 alcalina (ALP) no cambiaron significativamente con el tratamiento. Las barras representan los niveles medios (SD) de ALP (n = 10 a 16 ratones por grupo) determinados al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

25 **[0052]** En la FIG. 39A y la FIG. 39B se muestra la puntuación de actividad de NAFLD (NAS) al inicio y al final del tratamiento. La puntuación de actividad de NAFLD (NAS) estuvo bien equilibrada al inicio y mejoró significativamente en los grupos de tratamiento combinado. La NAS, definida como la suma compuesta no ponderada de puntuaciones histológicas de
30 abombamiento, esteatosis e inflamación lobulillar, se determinó al inicio (FIG. 39A) y después de 12 semanas de tratamiento (FIG. 39B). Los puntos representan ratones individuales en cada grupo de tratamiento (n=14 a 16). Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN

determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones.

*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0053] En la FIG. 40A y la FIG. 40B se muestra esteatosis hepática mediante análisis morfométrico histológico. La combinación del Compuesto 2 y el Compuesto 1 dio como resultado mayores reducciones en la esteatosis hepática según lo determinado mediante análisis morfométrico histológico. La esteatosis hepatocelular, incluido el porcentaje de hepatocitos con gotitas de lípidos y el contenido de lípidos en el hígado como porcentaje de área fraccional (FA), se determinó mediante análisis morfométrico de muestras histológicas del hígado al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones.

*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0054] En la FIG. 41 se muestra el tamaño de las gotas de lípidos de los hepatocitos. El tratamiento combinado reduce significativamente el tamaño de las gotas de lípidos de los hepatocitos. El tamaño de las gotas de lípidos se determinó mediante análisis morfométrico de muestras histológicas del hígado al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0055] En la FIG. 42 se muestra Plasma CK18 M30. Los niveles del biomarcador de apoptosis citoqueratina 18 M30 (CK18 M30) no cambiaron significativamente con el tratamiento. CK18 M30, un biomarcador de apoptosis, se midió en muestras de plasma al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0056] En la FIG. 43A y la FIG. 43B se muestra la expresión de proteínas hepáticas de Galectina-3 y proteínas actina del músculo liso. El tratamiento con el compuesto 2 reduce la expresión de Galectina-3 (Gal-3). La expresión de Gal-3 (FIG. 43A) y α -actina del músculo liso (α -SMA) (FIG. 43B) se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) de los hígados de los ratones tratados al final del estudio. Comparación estadística con control de vehículo DIO-GAN determinado mediante ANOVA seguido de corrección de Tukey para múltiples comparaciones.

*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0057] En la FIG. 44 se muestra la expresión de genes metabólicos de energía y lípidos en

el hígado. Comparación de los valores de expresión genética entre los grupos de tratamiento con Compuesto 1 elevado y Combo elevado para genes seleccionados involucrados en el metabolismo energético y lipídico. Las muestras de hígado se procesaron para el análisis transcriptómico mediante RNAseq al final. Los puntos representan los valores medios de expresión del cambio (n = 10 ratones por grupo) en relación con el control del vehículo DIO-GAN. El color rojo y azul indica la dirección del cambio (rojo = aumento de expresión; azul = disminución de expresión) entre el vehículo DIO-GAN y los grupos de control no graso. La línea punteada indica la línea de identidad. La línea continua se generó mediante análisis de regresión lineal de los valores de expresión de cambio para genes seleccionados en los grupos de tratamiento con Compuesto 1 elevado y Combo elevado. Seleccionar genes implicados en el metabolismo energético y lipídico. Escualeno epoxidasa (Sqle), 7-deshidrocolesterol (Dhcr7), hidroximetilglutaril-CoA sintasa (Hmgcs1) y estearoil-CoA desaturasa (Scd1).

[0058] En la FIG. 45A, la FIG. 45B, la FIG. 45C y la FIG. 45D se muestra la expresión de genes seleccionados implicados en el metabolismo energético y lipídico. Expresión hepática de genes implicados en el metabolismo energético y lipídico. Las muestras de hígado se procesaron para el análisis transcriptómico mediante RNAseq al final. Las barras representan valores medios (SD) de expresión (FPKM) para genes seleccionados involucrados en el metabolismo energético y lipídico que se muestran. Escualeno epoxidasa (Sqle, FIG. 45A), 7-deshidrocolesterol (Dhcr7, FIG. 45B), hidroximetilglutaril-CoA sintasa (Hmgcs1, FIG. 45C) y estearoil-CoA desaturasa (Scd1, FIG. 45D). No graso, blanco (barra más a la izquierda); control de vehículo DIO-GAN, gris (segundo desde la izquierda); Compuesto 2, azul (tercero desde la izquierda); Compuesto 1 bajo, naranja claro (cuarto desde la izquierda); Compuesto 1 medio, naranja (quinto desde la izquierda); Compuesto 1 elevado, naranja oscuro (cuarto desde la derecha); Combo bajo, violeta claro (tercero desde la derecha); Combo medio, morado (segundo desde la derecha); Combo elevado, violeta oscuro (barra más a la derecha). Se muestra la comparación estadística para el grupo de tratamiento individual en relación con el control del vehículo DIO-GAN *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001. Los grupos de tratamiento combinado se compararon adicionalmente con el Compuesto 2 (+p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,0001, ++++p<0,00001) o sus respectivos grupos de tratamiento con un solo agente del Compuesto 1 (es decir, Compuesto 1 bajo frente a Combo bajo); #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,0001, ####p<0,00001.

[0059] En la FIG. 46 se muestra la expresión de genes implicados en la fibrosis y la inflamación. Expresión hepática de genes implicados en la fibrosis y la inflamación. Las muestras de hígado se procesaron para el análisis transcriptómico mediante RNAseq al final. Las barras representan valores medios (SD) de expresión (FPKM) para genes seleccionados implicados en la fibrosis y la inflamación. Colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1), actina alfa 2 actina lisa (Acta2), Galectina 3 (Lgals3) y molécula de adhesión celular de melanoma (CD146). No graso, blanco (barra más a la izquierda); control de vehículo DIO-GAN, gris (segundo desde la izquierda); Compuesto 2, azul (tercero desde la izquierda); Compuesto 1 bajo, naranja claro (cuarto desde la izquierda); Compuesto 1 medio, naranja (quinto desde la izquierda); Compuesto 1 elevado, naranja oscuro (cuarto desde la derecha); Combo bajo, violeta claro (tercero desde la derecha); Combo medio, morado (segundo desde la derecha); Combo elevado, violeta oscuro (barra más a la derecha). Se muestra la comparación estadística para el grupo de tratamiento individual en relación con el control del vehículo DIO-GAN *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001.

[0060]

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0061] Tal como se utilizan en este documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario. Además, si algún término o símbolo utilizado en este documento no se define como se establece a continuación, tendrá su significado común en la técnica.

[0062] Se pretende que «que comprende» signifique que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. «Que consistente esencialmente en», cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación. Por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en este documento no excluiría otros elementos que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. «Que consistente en» significará excluir más que una pequeña cantidad de, por ejemplo, otros ingredientes y pasos sustanciales del método enumerados. Las modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance

de esta invención.

[0063] «Terapia combinada» o «tratamiento combinado» se refiere al uso de dos o más fármacos o agentes en el tratamiento, por ejemplo, el uso del compuesto 1 como se utiliza en el presente documento junto con otro agente útil para tratar trastornos hepáticos, tales como NAFLD, NASH y los síntomas y manifestaciones de cada uno de ellos es una terapia combinada. La administración en «combinación» se refiere a la administración de dos agentes (por ejemplo, el compuesto 1 como se utiliza en el presente documento y otro agente) de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. Por lo tanto, la administración en combinación no requiere que se use una única composición farmacéutica, la misma formulación o incluso la misma vía de administración para la administración de ambos agentes o que los dos agentes se administren exactamente al mismo tiempo. Ambos agentes también pueden formularse en una única composición farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo no limitante de dicha composición única es una composición oral o una forma de dosificación oral. Por ejemplo, y sin limitación, se contempla que el compuesto 1 pueda administrarse en terapia combinada con otro agente de acuerdo con la presente invención.

[0064] El término «excipiente», tal como se usa en este documento, significa una sustancia inerte o inactiva que puede usarse en la producción de un fármaco o producto farmacéutico, tal como un comprimido que contiene un compuesto de la invención como ingrediente activo. El término excipiente puede abarcar varias sustancias, incluidas, entre otras, cualquier sustancia utilizada como aglutinante, desintegrante, recubrimiento, auxiliar de compresión o encapsulación, crema o loción, lubricante, soluciones para administración parenteral, materiales para comprimidos masticables, edulcorante o saborizante, agente de suspensión o gelificante o agente de granulación húmeda. Los aglutinantes incluyen, por ejemplo, carbómeros, povidona, goma xantana, etc.; los recubrimientos incluyen, por ejemplo, acetato de celulosa, ftalato, etilcelulosa, goma gellan, maltodextrina, recubrimientos entéricos, etc.; los auxiliares de compresión o encapsulación incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, dextrosa, fructosa dc (dc = directamente compresible), miel dc, lactosa (anhidra o monohidrato; opcionalmente en combinación con aspartamo, celulosa o celulosa microcristalina), almidón dc, sacarosa, etc.; los desintegrantes incluyen, por ejemplo, croscarmelosa sódica, goma gellan, glicolato de almidón de sodio, etc.; las cremas o lociones incluyen, por ejemplo, maltodextrina, carragenanos, etc.;

los lubricantes incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, fumarato de estearilo de sodio, etc.; los materiales para los comprimidos masticables incluyen, por ejemplo, dextrosa, fructosa dc, lactosa (monohidrato, opcionalmente en combinación con aspartamo o celulosa), etc.; los agentes de suspensión o gelificación incluyen, por ejemplo, carragenano, glicolato de almidón de sodio, goma xantana, etc.; los edulcorantes incluyen, por ejemplo, aspartamo, dextrosa, fructosa dc, sorbitol, sacarosa, etc.; y los agentes de granulación húmeda incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, maltodextrina, celulosa microcristalina, etc.

[0065] «Paciente» se refiere a mamíferos e incluye humanos y mamíferos no humanos. Los ejemplos de pacientes incluyen, entre otros, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, cerdos, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, vacas y humanos. En algunas modalidades, paciente se refiere a un ser humano.

[0066] «Farmacéuticamente aceptable» se refiere a seguro y no tóxico, preferiblemente para administración *in vivo*, más preferiblemente, para administración humana.

[0067] «Sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a una sal que es farmacéuticamente aceptable. Un compuesto descrito en este documento se puede administrar como una sal farmacéuticamente aceptable.

[0068] «Sal» se refiere a un compuesto iónico formado entre un ácido y una base. Cuando el compuesto proporcionado en este documento contiene un grupo funcional ácido, tales sales incluyen, sin limitación, sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y amonio. Tal como se usa en este documento, las sales de amonio incluyen sales que contienen bases nitrogenadas protonadas y bases nitrogenadas alquiladas. Los cationes ilustrativos y no limitantes útiles en sales farmacéuticamente aceptables incluyen cationes Na, K, Rb, Cs, NH₄, Ca, Ba, imidazolio y amonio a base de aminoácidos naturales. Cuando los compuestos utilizados en este documento contienen un grupo funcional básico, tales sales incluyen, entre otras, sales de ácidos orgánicos, tales como ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, y ácidos minerales, tales como haluros de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares. Los aniones ilustrativos y no limitantes útiles en sales farmacéuticamente aceptables incluyen oxalato, maleato, acetato, propionato, succinato, tartrato, cloruro, sulfato, bisulfato, fosfato monobásico, dibásico y tribásico, mesilato, tosilato y similares.

[0069] «Cantidad terapéuticamente eficaz» o dosis de un compuesto o una composición se refiere a esa cantidad del compuesto o de la composición que da como resultado una reducción

o inhibición de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. Los resultados pueden requerir múltiples dosis del compuesto o la composición.

[0070] Como se utilizan en este documento, «tratamiento» o «que trata» hacen referencia a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: disminuir uno o más síntomas resultantes de la enfermedad o trastorno, disminuir la extensión de la enfermedad o trastorno, estabilizar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad o trastorno), retrasar la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno, retrasar o ralentizar la evolución de la enfermedad o trastorno, mejorar el estado de la enfermedad o trastorno, proporcionar una remisión (ya sea parcial o total) de la enfermedad o trastorno, disminuir la dosis de uno o más de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad o trastorno, mejorar el efecto de otro medicamento utilizado para tratar la enfermedad o trastorno, retrasar la evolución de la enfermedad o trastorno, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia de un paciente. El término «tratamiento» también incluye una reducción de las consecuencias patológicas de la enfermedad o trastorno. Los métodos de la invención contemplan cualesquiera uno o más de estos aspectos del tratamiento.

[0071] Tal como se utiliza en este documento, «retrasar» el desarrollo de una enfermedad significa postergar, dificultar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad y/o enlentecer la progresión o alterar el proceso y/o curso de la enfermedad subyacente una vez que se ha desarrollado. Este retraso puede ser de diferentes duraciones, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo que está siendo tratado. Como resulta evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, de hecho, abarcar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla síntomas clínicos asociados con la enfermedad. Un método que «retrasa» el desarrollo de una enfermedad es un método que reduce la probabilidad de desarrollo de la enfermedad en un período de tiempo determinado y/o reduce la extensión de la enfermedad en un período de tiempo determinado, cuando se compara con no usar el método, lo que incluye la estabilización de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad.

[0072] Un individuo que está «en riesgo» de desarrollar una enfermedad puede tener o no una enfermedad detectable, y puede haber mostrado o no una enfermedad detectable antes de

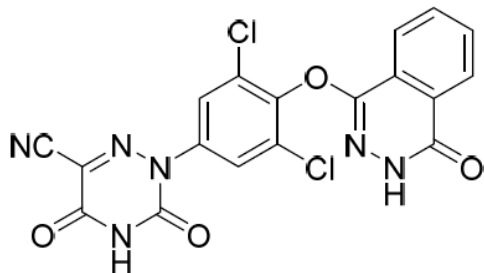
los métodos de tratamiento descritos en este documento. «En riesgo» denota que un individuo tiene uno o más de los llamados factores de riesgo, que son parámetros mensurables que se correlacionan con el desarrollo de una enfermedad. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una probabilidad más elevada de desarrollar la enfermedad que un individuo sin estos factores de riesgo. Estos factores de riesgo incluyen, de modo no taxativo, edad, sexo, raza, dieta, historia de enfermedades previas, presencia de enfermedad precursora, consideraciones genéticas (es decir, hereditarias) y exposición al entorno. En algunas modalidades, los compuestos pueden administrarse a un sujeto (incluido un ser humano) que está en riesgo o tiene antecedentes familiares de la enfermedad o afección.

[0073] Los términos «opcional» u «opcionalmente» como se usan a lo largo de la memoria descriptiva significan que la circunstancia o evento descrito posteriormente puede ocurrir, aunque no necesariamente, de modo que la descripción incluya casos en los que ocurre el evento o la circunstancia y casos en los que no ocurre. Por ejemplo, «el átomo de nitrógeno se oxida opcionalmente para proporcionar el resto N-óxido ($N \rightarrow O$)» significa que el átomo de nitrógeno puede oxidarse, aunque no necesariamente, y la descripción incluye situaciones en las que el átomo de nitrógeno no se oxida y situaciones en las que el átomo de nitrógeno se oxida.

[0074] Tal como se utiliza en este documento, el término «sustancialmente como se muestra en» cuando se refiere, por ejemplo, a un patrón de XRPD, incluye un patrón o gráfico que no es necesariamente idéntico a los representados en este documento, pero cae dentro de los límites de errores o desviaciones experimentales cuando un experto en la técnica lo considera.

Composiciones y formulaciones farmacéuticamente aceptables

[075] Composiciones farmacéuticamente aceptables o simplemente «composiciones farmacéuticas» del Compuesto 1, un agonista del receptor beta de la hormona tiroidea (THR- β),



Compuesto 1

son abarcados por esta invención. Por lo tanto, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de adición de base, tal como una sal formada con una base inorgánica u orgánica. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de potasio del compuesto 1. En algunas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de sodio del compuesto 1. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden adoptar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica o rectal o una forma adecuada para administración por inhalación.

[0076] En un aspecto, el Compuesto 1 como se detalla en este documento puede estar en una forma purificada y en este documento se detallan composiciones que comprenden un Compuesto 1 en su forma purificada. Se proporcionan composiciones que comprenden el Compuesto 1 como se detalla en este documento o una sal de este, tales como composiciones de compuestos sustancialmente puros. En algunas modalidades, una composición que contiene el Compuesto 1 como se detalla en este documento o una sal de este está en forma sustancialmente pura. En una variación, «sustancialmente pura» se refiere a una composición que contiene no más del 35 % de impurezas, en donde la impureza denota un compuesto distinto del compuesto que comprende la mayor parte de la composición o una sal de esta. Por ejemplo, una composición de un compuesto sustancialmente puro se refiere a una composición que contiene no más de 35% de impurezas, en donde la impureza denota un compuesto distinto del compuesto o una sal de este. En una variación, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 25 % de impurezas. En otra variación, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 20 % de impurezas. En incluso otra variación, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 10 % de impurezas. En una variación adicional, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 5 % de impurezas. En otra variación, se proporciona una composición de un compuesto

sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 3 % de impurezas. En incluso otra variación, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más de 1 % de impurezas. En una variación adicional, se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro o una sal de este en donde la composición contiene no más del 0,5 % de impurezas. En incluso otras variaciones, una composición de un compuesto sustancialmente puro significa que la composición contiene no más del 15 % o preferiblemente no más del 10 % o más preferiblemente no más del 5 % o incluso más preferiblemente no más del 3 % y lo más preferiblemente no más del 1 % de impurezas.

10 **[0077]** En una variación, el Compuesto 1 es un compuesto sintético preparado para su administración a un individuo, tal como un humano. En otra variación, se proporcionan composiciones que contienen el Compuesto 1 en forma sustancialmente pura. En otra variación, la invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden el Compuesto 1 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra variación, se proporcionan métodos para administrar el compuesto 1. Las formas purificadas, las composiciones farmacéuticas y los métodos de administración de los compuestos son adecuados para cualquier compuesto o forma de este que se detalla en este documento.

15 **[0078]** El Compuesto 1 se puede formular para cualquier vía de administración disponible, incluida una forma de administración oral, mucosa (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal), parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa), tópica o transdérmica. Se puede formular un Compuesto 1 con vehículos adecuados para proporcionar formas de administración que incluyen, entre otras, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas (tales como cápsulas de gelatina dura o cápsulas de gelatina elásticas blandas), sellos, pastillas, tabletas, gomas, dispersiones, supositorios, ungüentos, cataplasmas (pastas),
25 pastas, polvos, apósitos, cremas, soluciones, parches, aerosoles (por ejemplo, aerosoles nasales o inhaladores), geles, suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceites en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite), soluciones y elixires.

30 **[0079]** Se puede usar Compuesto 1 en la preparación de una formulación, tal como una formulación farmacéutica, mediante la combinación del Compuesto 1 como un principio activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como los mencionados anteriormente.

Dependiendo de la forma terapéutica del sistema (por ejemplo, parche transdérmico frente a comprimido oral), el vehículo puede estar en varias formas. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes rehumectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, ajustadores y sales para el ajuste de la presión osmótica, amortiguadores, agentes de recubrimiento o antioxidantes. Las formulaciones que comprenden el Compuesto 1 también pueden contener otras sustancias que tienen valiosas propiedades terapéuticas. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse mediante métodos farmacéuticos conocidos. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 21.^a ed. (2005), que se incorpora en este documento mediante esta referencia.

[0080] Los compuestos como se describen en este documento se pueden administrar a individuos (por ejemplo, un humano) en forma de composiciones orales generalmente aceptadas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas de gel con una cubierta dura o blanda, emulsiones o suspensiones. Ejemplos de vehículos que pueden usarse para la preparación de tales composiciones son celulosa microcristalina, manitol, lactosa, almidón de maíz o sus derivados, talco, estearato o sus sales, etc. Los vehículos aceptables para cápsulas de gel con cubierta blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos, etc. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizadores, agentes rehumectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, ajustadores y sales para el ajuste de la presión osmótica, amortiguadores, agentes de recubrimiento o antioxidantes.

[0081] El compuesto 1 tiene una solubilidad acuosa muy baja, incluso cuando se administra en forma de sal. La sal de potasio del Compuesto 1 tiene una solubilidad de aproximadamente 2,2 µg/mL en un amortiguador de pH 6,0 y una solubilidad de alrededor de 8,0 µg/mL en un amortiguador de pH 8,0. Los solubilizantes como el poloxámero 188 dan como resultado una degradación significativa del Compuesto 1. Se ha descubierto que tensioactivos iónicos particulares como el laurilsulfato de sodio (SLS) son compatibles con el Compuesto 1 y se pueden coformular con el Compuesto 1 y sales farmacéuticamente aceptables de este, con degradación mínima o nula del compuesto. La coformulación del Compuesto 1, o sales farmacéuticas de este, con tensioactivos iónicos (por ejemplo, SLS) da como resultado una mejora espectacular de la solubilidad en todos los niveles de pH.

[0082] En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y alrededor del 1 % en peso a alrededor del 10 % en peso de SLS. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y alrededor del 1 % en peso a alrededor del 8 % en peso de SLS. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y alrededor del 1,5 % en peso a alrededor del 8 % en peso de SLS. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y alrededor del 1,5 % en peso a alrededor del 5 % en peso de SLS. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y alrededor del 5 % en peso de SLS. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende una sal de potasio del Compuesto 1 y alrededor del 1,5 % en peso de laurilsulfato de sodio (SLS).

[0083] Otros solubilizantes potenciales que se pueden usar en combinación con el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, incluyen docusato de sodio, polisorbato, un fosfolípido o succinato de D- α -tocoferil polietilenglicol (Vitamina E TPGS).

[0084] En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y laurilsulfato de sodio. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, laurilsulfato sódico y croscarmelosa sódica. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, laurilsulfato de sodio, croscarmelosa sódica, dióxido de silicio coloidal y estearato de magnesio. En algunas modalidades, se proporciona una formulación que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, laurilsulfato sódico, croscarmelosa sódica, dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, una cápsula de hipromelosa (HPMC), manitol y celulosa microcristalina.

[0085] En algunas modalidades, se proporciona el Compuesto 1 formulado en una cápsula en cualquier formulación descrita en el presente documento. En algunas modalidades, se proporciona una formulación en cápsula que contiene de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 50 mg del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, se proporciona una formulación en cápsula que contiene alrededor de 0,5 mg,

alrededor de 1 mg, alrededor de 2 mg, alrededor de 3 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 6 mg, alrededor de 10 mg, aproximadamente 15 mg, alrededor de 25 mg o alrededor de 50 mg de Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[0086] En algunas modalidades, se proporciona el Compuesto 1 formulado en una cápsula con uno o más de varios otros componentes como se enumeran a continuación en la Tabla A. En algunas modalidades, se proporciona el Compuesto 1 formulado en una cápsula con uno o más de varios otros componentes en las cantidades como se describe a continuación en la Tabla A.

Tabla A.

Componente	Peso/mg	
Compuesto 1	1,1-54,3	
Celulosa microcristalina	59,3-177,9	
Manitol	29,6-88,8	
Laurilsulfato de sodio	5,0-15,0	
Croscarmelosa sódica	3,0-9,0	
Dióxido de silicio coloidal	1,0-3,0	
Estearato de magnesio	1,0-3,0	
Cápsula HPMC, tamaño 0	1 cápsula	
Total	100	300

[0087] En algunas modalidades, se proporciona el Compuesto 1 formulado en un comprimido en cualquier formulación descrita en el presente. En algunas modalidades, se proporciona una formulación de comprimido que contiene alrededor de 0,5 mg a alrededor de 50 mg del compuesto 1. Se entenderá que en todas las modalidades, el peso del Compuesto 1

se refiere a la parte activa de la molécula (ácido libre). En modalidades en las que se usa una forma de sal del Compuesto 1, el peso de la sal se ajustará para garantizar que la cantidad adecuada del compuesto activo esté en la composición. En algunas modalidades, se proporciona una formulación en comprimido que contiene alrededor de 0,5 mg, alrededor de 1 mg, alrededor de 2 mg, alrededor de 3 mg, alrededor de 5 mg, alrededor de 6 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 15 mg, alrededor de 25 mg o alrededor de 50 mg de Compuesto 1.

[0088] La presente divulgación abarca además kits (por ejemplo, paquetes farmacéuticos). El kit proporcionado puede comprender las composiciones farmacéuticas o los compuestos descritos en el presente documento y recipientes (por ejemplo, frascos de medicamento, ampollas, frascos, jeringas y/o subenvases u otros recipientes adecuados).

Métodos de uso y usos

[0089] Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse en algunos aspectos en el tratamiento o prevención de trastornos hepáticos. En algunas modalidades, el método para tratar o prevenir un trastorno hepático en un paciente que lo necesita comprende administrar al paciente el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[0090] Los trastornos hepáticos incluyen, entre otros, inflamación del hígado, fibrosis y esteatohepatitis. En algunas modalidades, el trastorno hepático se selecciona de inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En algunas modalidades, el trastorno hepático se selecciona de: fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, NAFLD y NASH. En una modalidad, el trastorno hepático es NASH. En otra modalidad, el trastorno hepático es inflamación del hígado. En otra modalidad, el trastorno hepático es fibrosis hepática. En otra modalidad, el trastorno hepático es fibrosis inducida por alcohol. En otra modalidad, el trastorno hepático es esteatosis. En otra modalidad, el trastorno hepático es esteatosis alcohólica. En otra modalidad, el trastorno hepático es NAFLD. En una modalidad, los métodos de tratamiento proporcionados en este documento dificultan o ralentizan la evolución de NAFLD a NASH. En una modalidad, los métodos de tratamiento proporcionados en este documento dificultan o ralentizan la evolución de NASH. La NASH puede evolucionar, por ejemplo, a uno o más de cirrosis hepática, cáncer hepático, etc. En

algunas modalidades, el trastorno hepático es NASH. En algunas modalidades, al paciente se le ha realizado una biopsia de hígado. En algunas modalidades, el método comprende además obtener los resultados de una biopsia de hígado.

[0091] En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar un trastorno hepático en un paciente que lo necesita, en donde el trastorno hepático se selecciona del grupo que consiste en inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

[0092] En el presente documento se proporcionan métodos para tratar o prevenir un trastorno hepático en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesita con el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. en donde el trastorno hepático se selecciona de inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

[0093] También se proporcionan en el presente documento métodos para impedir o ralentizar la progresión de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesita, que comprende administrar el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. También se proporcionan en el presente documento métodos para impedir o ralentizar la progresión de NASH en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesita, que comprenden administrar el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[0094] En algunas modalidades, en el presente documento se proporciona un método para reducir el daño hepático que comprende administrar el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este a un individuo que lo necesita, en donde se reduce la fibrosis. En algunas modalidades, se reduce el nivel de expresión de uno o más marcadores de

fibrosis. En algunas modalidades, se reduce el nivel de expresión de Ccr2, Col1a1, Col1a2, Col1a3, Cxcr3, Dcn, Hgf, Il1a, Inhbe, Lox, Loxl1, Loxl2, Loxl3, Mmp2, Pdgfb, Plau, Serpine1, Perpinh1, Snai, Tgfb1, Tgfb3, Thbs1, Thbs2, Timp2 y/o Timp3. En algunas modalidades, se reduce el nivel de colágeno. En algunas modalidades, se reduce el nivel de fragmentos de colágeno. En algunas modalidades, se reduce el nivel de expresión del marcador de fibrosis al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 veces. En algunas modalidades, el nivel de expresión del marcador de fibrosis se reduce alrededor de 2 veces, alrededor de 3 veces, alrededor de 4 veces o alrededor de 5 veces.

[0095] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para reducir el daño hepático que comprende la administración del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este a un individuo que lo necesita, en donde se reduce la inflamación. En algunas modalidades, se reducen uno o más marcadores de inflamación. En algunas modalidades, se reduce el nivel de expresión de Adgre1, Ccr2, Ccr5, Il1A y/o Tlr4. En algunas modalidades, el nivel de expresión del marcador de inflamación se reduce al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces. En algunas modalidades, el nivel de expresión del marcador de fibrosis se reduce alrededor de 2 veces, alrededor de 3 veces, alrededor de 4 veces o alrededor de 5 veces.

[0096] En un paciente, los niveles de fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl transferasa (GGT), alanina aminotransferasa (ALT) y/o aspartato aminotransferasa (AST) pueden estar elevados. En algunas modalidades, se proporciona en el presente documento un método para reducir el daño hepático que comprende administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde los niveles de GGT, ALT y/o AST están elevados antes del tratamiento. En algunas modalidades, el nivel de ALT del paciente es alrededor de 2 a 4 veces mayor que el límite superior de los niveles normales. En algunas modalidades, el nivel de AST del paciente es alrededor de 2 a 4 veces mayor que el límite superior de los niveles normales. En algunas modalidades, el nivel de GGT del paciente es alrededor de 1,5 a 3 veces mayor que el límite superior de los niveles normales. En algunas modalidades, el nivel de fosfatasa alcalina del paciente es alrededor de 1,5 a 3 veces mayor que el límite superior de los niveles normales. Los métodos para determinar los niveles de estas moléculas son bien conocidos. Los niveles normales de ALT en la sangre varían de alrededor de 7 a 56 unidades/litro. Los niveles normales de AST en sangre varía de alrededor de 10 a 40 unidades/litro. Los niveles normales de GGT

en sangre varían de alrededor de 9 a 48 unidades/litro. Los niveles normales de fosfatasa alcalina en la sangre oscilan entre alrededor de 53 y 128 unidades/litro para un hombre de 20 a 50 años y entre 42 y 98 unidades/litro para una mujer de 20 a 50 años.

[0097] La deficiencia de hormona tiroidea es más común en pacientes con NAFLD y NASH (Pagadala MR, Zein CO, Dasarathy S, Yerian LM, Lopez R, McCullough AJ. Prevalence of hypothyroidism in nonalcoholic fatty liver disease Dig Dis Sci. 2012;57:528-34.). La glándula tiroides produce triyodotironina (T3) y tiroxina (T4), bajo el control de la tiotropina (hormona estimulante de la tiroides [TSH]) de la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de tiotropina (TRH) del hipotálamo. Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se ha relacionado el agonismo de THR- β en el hígado en la reducción de la T4 libre sin cambios en la T3 o la TSH, lo que puede atribuirse a la modulación periférica de la hormona tiroidea (Taub R, Chiang E, Chabot-Blanchet M, Kelly MJ, Reeves RA, Guertin MC, et al. Lipid lowering in healthy volunteers treated with multiple doses of MGL-3196, a liver-targeted thyroid hormone receptor- β agonist. Atherosclerosis. 2013;230:373-80.; Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. Mol Endocrinol 1990;4:743-748.). La evidencia de impacto en el eje tiroideo central puede representar un efecto indeseable. Por consiguiente, en algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, no da como resultado un cambio en la TSH, T3 libre o T4 sérica del paciente a niveles fuera del rango normal.

[0098] En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, no da como resultado un cambio en los biomarcadores cardíacos del paciente, lo que incluye CK, CK-MB y troponina I, a niveles fuera del rango normal.

[0099] La globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) se produce en el hígado y se une a las hormonas sexuales y las estabiliza, incluidos los andrógenos y los estrógenos, lo que afecta las fracciones totales y libres de las hormonas circulantes (Hammond 2016). El agonismo de THR- β regula positivamente la expresión de SHBG, lo que lo convierte en un marcador útil de PD. En algunas modalidades, la administración del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, da como resultado un aumento de la SHBG sérica del paciente. En algunas modalidades, el aumento de la SHBG sérica del paciente se produce dentro de los 4 días posteriores a la administración del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la SHBG en suero del paciente

aumenta al menos un 5 % con respecto al valor basal después de la administración del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, el nivel de SHBG en suero del paciente aumenta en al menos el 10 % con respecto al nivel basal después de la administración del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 En algunas modalidades, el nivel de SHBG en suero del paciente aumenta en al menos el 25 % con respecto al nivel basal después de la administración del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[00100] En algunas modalidades, el paciente es un ser humano. La obesidad está altamente correlacionada con NAFLD y NASH, pero las personas delgadas también pueden verse afectadas por NAFLD y NASH. En consecuencia, en algunas modalidades, el paciente es obeso. En algunas modalidades, el paciente no es obeso. La obesidad también puede estar relacionada con otras enfermedades o causarlas, como la diabetes mellitus o los trastornos cardiovasculares. En consecuencia, en algunas modalidades, el paciente también tiene diabetes mellitus y/o un trastorno cardiovascular. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que las comorbilidades, como la obesidad, la diabetes mellitus y los trastornos cardiovasculares, pueden hacer que la NAFLD y la NASH sean más difíciles de tratar. Por el contrario, el único método actualmente reconocido para abordar NAFLD y NASH es el descenso de peso, que probablemente tendría poco o ningún efecto en un paciente delgado.

[00101] El riesgo de NAFLD y NASH aumenta con la edad, pero los niños también pueden sufrir NAFLD y NASH, y en la bibliografía se informa de niños de tan solo 2 años de edad (Schwimmer, et ál., Pediatrics, 2006, 118:1388-1393). En algunas modalidades, el paciente tiene entre 2 y 17 años, tal como 2 a 10, 2 a 6, 2 a 4, 4 a 15, 4 a 8, 6 a 15, 6 a 10, 8 a 17, 8 a 15, 8 a 12, 10 a 17 o 13 a 17 años. En algunas modalidades, el paciente tiene entre 18 y 64 años, tal como 18 a 55, 18 a 40, 18 a 30, 18 a 26, 18 a 21, 21 a 64, 21 a 55, 21 a 40, 21 a 30, 21 a 26, 26 a 64, 26 a 55, 26 a 40, 26 a 30, 30 a 64, 30 a 55, 30 a 40, 40 a 64, 40 a 55 o 55 a 64 años. En algunas modalidades, el paciente tiene 65 años o más, tal como 70 o más, 80 o más, o 90 o más.

[00102] La NAFLD y la NASH son causas comunes de trasplante de hígado, pero los pacientes que ya recibieron un trasplante de hígado a menudo desarrollan NAFLD y/o NASH nuevamente. En consecuencia, en algunas modalidades, el paciente ha tenido un trasplante de hígado.

[00103] En algunas modalidades, el tratamiento de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento da como resultado una puntuación reducida de la actividad NAFLD (NAS) en un paciente. Por ejemplo, en algunas modalidades, la esteatosis, la inflamación y/o el abombamiento se reducen tras el tratamiento. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento reducen la fibrosis hepática. En algunas modalidades, los métodos reducen los triglicéridos séricos. En algunas modalidades, los métodos reducen los triglicéridos en el hígado.

[00104] La dislipidemia, caracterizada por niveles elevados de colesterol y triglicéridos de lipoproteínas de baja densidad (LDL), es un factor de riesgo clave para la enfermedad cardiovascular (Nelson RH. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. Prim Care. marzo de 2013; 40(1):195-211.) y se observa comúnmente en pacientes con NASH (Loomba R. «Nonalcoholic fatty liver disease progression rates to cirrhosis and progression of cirrhosis to decompensation and mortality: a real world analysis of Medicare data.» Aliment Pharmacol Ther. 2020;51:1149-59.). Además, la dislipidemia es un posible factor patogénico de la inflamación hepática subyacente a la NASH (Walenbergh S. «Cholesterol is a significant risk factor for nonalcoholic steatohepatitis.» Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. 2015; 9:11:1343-46.). La apolipoproteína B (Apo B) está asociada con el colesterol LDL en la sangre y puede ser útil en la evaluación del perfil lipídico de un paciente. Por consiguiente, en algunas modalidades, la administración del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye la Apo B sérica del paciente. En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, da como resultado una reducción de la Apo B sérica del paciente. B dentro de los 4 días posteriores a la administración. En algunas de tales modalidades, la reducción en la Apo B sérica del paciente es al menos del 5 % con respecto al valor basal. En algunas de dichas modalidades, la reducción de Apo B en suero del paciente es de al menos el 10 % con respecto al valor basal. En algunas de dichas modalidades, la reducción de Apo B en suero del paciente es de al menos el 15 % con respecto al valor basal.

[00105] En algunas modalidades, el paciente se encuentra en riesgo de desarrollar un efecto adverso antes de la administración de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. En algunas modalidades, el efecto adverso es un efecto adverso que afecta el riñón, el pulmón, el corazón y/o la piel. En algunas modalidades, el efecto adverso es prurito.

[00106] En algunas modalidades, el paciente ha recibido una o más tratamientos previos. En algunas modalidades, el trastorno hepático progresó durante el tratamiento. En algunas modalidades, el paciente sufrió prurito durante al menos uno de los uno o más tratamientos anteriores.

- 5 **[00107]** Los modelos animales preclínicos con el Compuesto 1 establecieron que un área bajo la curva plasmática en estado estacionario desde el tiempo 0 hasta el infinito ($AUC_{0-\infty}$) y aproximadamente 3320 ng*hg/mL era una exposición suficiente para garantizar la eficacia según varios marcadores farmacodinámicos, como se describe en los ejemplos siguientes. Las exposiciones al compuesto 1 de 3320 ng*hg/mL o más no producen efectos indeseables de la
- 10 hormona tiroidea a menudo asociados con el agonismo de THR. Por ejemplo, en los estudios de dosis única ascendente descritos en los ejemplos, el $AUC_{0-\infty}$ en plasma en estado estacionario del Compuesto 1 de hasta aproximadamente 50 000 ng*hg/ml no produjo ningún efecto secundario significativo.

- [00108]** En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra diariamente al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) a una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 2500 ng*h/ml a alrededor de 50 000 ng*h/ml. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una
- 15 dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 3000 ng*h/mL a alrededor de 50 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 5000 ng*h/mL a alrededor de 50 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el
- 20 Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 5000 ng*h/mL a alrededor de 30 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal
- 25 farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en
- 30

estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 5000 ng*h/mL a alrededor de 25 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 5000 ng*h/mL a alrededor de 20 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 3000 ng*h/mL a alrededor de 10 000 ng*h/mL. En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra a diario al individuo que lo necesita (por ejemplo, un paciente con NASH) en una dosis para obtener un área bajo la curva de plasma en estado estacionario del momento 0 al infinito ($AUC_{0-\infty}$) de alrededor de 5000 ng*h/mL a alrededor de 10 000 ng*h/mL.

[00109] Sorprendentemente, se ha descubierto que el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede conseguir la exposición deseada en dosis muy bajas. En algunas modalidades de la divulgación, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se puede administrar a pacientes por vía oral una vez al día en dosis tan bajas como de 1 mg o menos e incluso así reducir suficientemente la actividad de la amina oxidasa y reducir la adhesión y transmigración de los linfocitos. Por ejemplo, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se puede administrar por vía oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (por ejemplo, NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 60 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 25 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg a alrededor de 15 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 2 mg a alrededor de 10 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el

Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 1 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 3 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 4 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 5 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 10 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 15 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 20 mg. Se entenderá que, en todas las modalidades, el peso del Compuesto 1 se refiere a la parte activa de la molécula (ácido libre). En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 30 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 50 mg. En algunas modalidades, se puede administrar el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de forma oral una vez al día a un paciente con un trastorno hepático (p. ej., NASH) en una dosis de alrededor de 60 mg. En modalidades donde se usa una forma de sal del Compuesto, se ajustará el peso de la sal para garantizar que se encuentre la cantidad adecuada del compuesto activo en la composición.

[00110] El período de tratamiento generalmente puede ser de una o más semanas. En algunas modalidades, el período de tratamiento es al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más. En algunas modalidades, el período de tratamiento es de alrededor de una semana a alrededor de un mes, de alrededor de un mes a alrededor de un año, de alrededor de un año a alrededor de varios años. En algunas modalidades, el período de tratamiento es de al menos alrededor de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más. En algunas modalidades, el período de tratamiento es el tiempo de vida restante del paciente.

[00111] La administración del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este puede ser una vez al día, dos veces al día o cada dos días, durante un período de tratamiento de una o más semanas. En algunas modalidades, la administración comprende administrar el compuesto a diario durante un período de tratamiento de una o más semanas. En algunas modalidades, la administración comprende administrar el compuesto dos veces al día durante un período de tratamiento de una o más semanas. En algunas modalidades, la administración comprende administrar el compuesto día por medio durante un período de tratamiento de una o más semanas.

[00112] En algunas modalidades, la cantidad de Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, administrada el día 1 del período de tratamiento es mayor o igual a las cantidades administradas en todos los días posteriores del período de tratamiento. En algunas modalidades, la cantidad administrada el día 1 del período de tratamiento es igual a las cantidades administradas en todos los días posteriores del período de tratamiento.

[00113] En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye la esteatosis en el individuo. Los métodos para evaluar la esteatosis son conocidos por el experto en la técnica y pueden incluir análisis histológico y asignación de puntuación histológica. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis

biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesita, en donde el tratamiento comprende reducir los marcadores histológicos asociados con la esteatosis.

5 **[00114]** En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye la inflamación del hígado en el individuo. Los métodos para evaluar la inflamación del hígado son conocidos por el experto y pueden incluir análisis histológico y asignación de puntuación histológica de inflamación lobulillar. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en la presente, en algunas modalidades, comprenden el tratamiento de un trastorno hepático tal como la inflamación del hígado, la
10 fibrosis hepática, la fibrosis inducida por alcohol, la esteatosis, la colangitis esclerosante primaria (PSC), la cirrosis biliar primaria (PBC), la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesita, en donde el tratamiento comprende la reducción de la inflamación lobulillar o de marcadores histológicos asociados con la inflamación lobulillar.

15 **[00115]** En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, reduce la fibrosis hepática en el individuo. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar la fibrosis hepática y estos pueden incluir análisis histológicos. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en la presente, en algunas modalidades, comprenden el tratamiento de un trastorno hepático tal como la
20 inflamación del hígado, la fibrosis hepática, la fibrosis inducida por alcohol, la esteatosis, la colangitis esclerosante primaria (PSC), la cirrosis biliar primaria (PBC), la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesita, en donde el tratamiento comprende la reducción de la fibrosis lobulillar o de marcadores histológicos asociados con la fibrosis.

25 **[00116]** En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye al menos uno o al menos dos de la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis en el individuo. Por tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por
30 alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica

(NASH) en un individuo que lo necesite, en donde el tratamiento comprende reducir al menos uno o al menos dos de esteatosis, inflamación lobulillar, fibrosis o marcadores histológicos de cualquiera de los anteriores.

5 **[00117]** En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye los triglicéridos séricos en el individuo. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica
10 (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesite, en donde el tratamiento comprende reducir los triglicéridos séricos.

[00118] En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye el colesterol total en suero en el individuo. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en
15 algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesite, en donde el tratamiento comprende reducir el colesterol en suero.

20 **[00119]** En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye la alanina aminotransferasa en suero en el individuo. Por lo tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis
25 alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesite, en donde el tratamiento comprende reducir la alanina aminotransferasa en suero.

[00120] En algunas modalidades, la administración del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, disminuye al menos uno o al menos dos de los
30 triglicéridos séricos, el colesterol total y la alanina aminotransferasa en el individuo. En algunas modalidades, la administración del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de

este, disminuye los triglicéridos séricos, el colesterol total y la alanina aminotransferasa en el individuo. Por tanto, se entiende que los métodos de tratamiento detallados en el presente documento, en algunas modalidades, comprenden tratar un trastorno hepático tal como inflamación del hígado, fibrosis hepática, fibrosis inducida por alcohol, esteatosis, esteatosis

5 alcohólica, colangitis esclerosante primaria (PSC), cirrosis biliar primaria (PBC), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un individuo que lo necesite, en donde el tratamiento comprende reducir al menos uno o al menos dos de los triglicéridos séricos, el colesterol total y la alanina aminotransferasa.

[00121] En algunas modalidades de lo anterior, se administra el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente en ayunas durante al menos 10 horas

10 antes de la administración de la dosis. En algunas modalidades, se administra el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que ha consumido una comida rica en grasas y calorías menos de 30 minutos antes de la administración de la dosis.

Polimorfos

15 **[00122]** En un aspecto, en el presente documento se proporciona un polimorfo del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Los polimorfos pueden tener propiedades tales como biodisponibilidad y estabilidad bajo ciertas condiciones que son adecuadas para usos médicos o farmacéuticos.

[00123] En algunas modalidades, se proporciona en el presente documento un tipo A

20 polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1. En algunas modalidades, el tipo A de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD sustancialmente como se muestra en la FIG. 16. Los ángulos 2-teta y las intensidades máximas relativas que pueden observarse para el tipo A de una sal de potasio del Compuesto 1 usando XRPD se muestran en la Tabla B a continuación.

25 Tabla B

Ángulo [$^{\circ}2\theta$]	Rel. Int. [%]
6,16	37,17
6,78	61,40
8,49	14,10
11,35	79,68

Ángulo [$^{\circ}2\theta$]	Rel. Int. [%]
13,51	28,22
14,44	43,58
15,76	27,65
16,81	13,90
19,77	8,02
20,51	100,00
24,63	32,19
25,97	38,26
26,68	15,27
29,13	42,93
31,00	6,24
31,75	10,08
34,09	9,97
35,67	16,95
36,47	8,52
37,74	10,88
38,90	10,20

[00124] En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que muestra al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez de los picos en ángulos 2-teta con la mayor intensidad en el patrón de XRPD como se muestra en la

5 FIG. 16 o según lo dispuesto en la Tabla B.

[00125] En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$ y $20,51 \pm 0,20$ grados. En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$, $14,44 \pm 0,20$, $20,51 \pm 0,20$ y $29,13 \pm 0,20$ grados. En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $6,16 \pm 0,20$, $6,78 \pm 0,20$, $11,35 \pm 0,20$, $13,51 \pm 0,20$, $14,44 \pm 0,20$,

10

15,76±0,20, 20,51±0,20, 24,63±0,20, 25,97±0,20 y 29,13±0,20 grados.

- [00126]** En algunas modalidades, se proporciona en la presente un tipo A polimórfico de una sal de sodio del Compuesto 1. En algunas modalidades, el tipo A de una sal de sodio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la FIG. 18. Se muestran los ángulos 2-teta y las intensidades de pico relativas que se pueden observar para el tipo A de una sal de sodio del Compuesto 1 con XRPD en la Tabla C que se encuentra a continuación.

Tabla C.

Pos. [°2θ]	Rel. Int. [%]
5,51	100,00
6,99	62,36
8,47	98,20
11,04	7,64
13,12	55,02
15,24	60,80
16,57	72,37
17,78	24,26
20,42	34,10
21,02	27,00
22,19	24,02
23,07	7,67
25,69	7,77
27,21	17,97
27,99	4,80
28,55	37,46
29,58	6,95
31,33	31,60
32,49	3,54
33,51	6,13
34,16	6,34

[00127] En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de sodio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que exhibe al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez de los picos en ángulos 2-teta con la intensidad máxima en el patrón de XRPD como se muestra en la FIG. 18 o como se proporciona en la Tabla C.

[00128] En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $5,51 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$ y $16,57 \pm 0,20$ grados. En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $5,51 \pm 0,20$, $6,99 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$, $15,24 \pm 0,20$ y $16,57 \pm 0,20$ grados. En algunas modalidades, el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 tiene un patrón de XRPD que comprende picos en ángulos 2-teta de $5,51 \pm 0,20$, $6,99 \pm 0,20$, $8,47 \pm 0,20$, $13,12 \pm 0,20$, $15,24 \pm 0,20$, $16,57 \pm 0,20$, $20,42 \pm 0,20$, $21,02 \pm 0,20$, $28,55 \pm 0,20$ y $31,33 \pm 0,20$ grados.

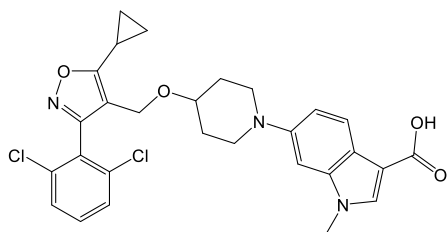
[00129] Debe entenderse que las intensidades relativas pueden variar dependiendo de una serie de factores, incluida la preparación de la muestra, el montaje y el instrumento y el procedimiento analítico y los ajustes utilizados para obtener el espectro. Las intensidades de pico relativas y las asignaciones de pico pueden variar dentro del error experimental. En algunas modalidades, las asignaciones de picos de XRPD enumeradas en el presente documento, incluso para el tipo A polimórfico de una sal de potasio del Compuesto 1 o para el tipo A polimórfico de una sal de sodio del Compuesto 1, pueden variar en $\pm 0,6$ grados, $\pm 0,4$ grados, $\pm 0,2$ grados o $\pm 0,1$ grados 2-teta. En algunas modalidades, las asignaciones de picos enumeradas en el presente documento pueden variar en $\pm 0,6$ grados 2-teta. En algunas modalidades, las asignaciones de picos que se enumeran en este documento pueden variar $\pm 0,4$ grados 2-teta. En algunas modalidades, las asignaciones de picos que se enumeran en este documento pueden variar $\pm 0,2$ grados 2-teta. En algunas modalidades, las asignaciones de picos que se enumeran en este documento pueden variar $\pm 0,1$ grados 2-teta.

Combinaciones

[00130] La presente divulgación proporciona además combinaciones del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con otros agentes terapéuticos que se usan para tratar enfermedades hepáticas. En particular, la presente divulgación proporciona combinaciones del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y otros

agentes terapéuticos usados en el tratamiento de NASH. Debido a su baja dosis clínica, como se describe en el presente documento, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, es un candidato atractivo para su uso en combinaciones de dosis fijas para el tratamiento de NASH.

- 5 **[00131]** En algunas modalidades, el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se administra en combinación con un agonista del receptor farnesoide X (FXR). En algunas modalidades, el agonista de FXR es ácido obeticólico. En algunas modalidades, el agonista de FXR es cilofexor. En algunas modalidades, el agonista de FXR es tropifexor. En algunas modalidades, el agonista de FXR es EYP001 (Vonafexor, INN propuesta). En algunas
- 10 modalidades, el agonista de FXR es MET409 (Metacrina). En algunas modalidades, el agonista de FXR es EDP-305 (de Enanta). En algunas modalidades, el agonista de FXR es



(o Compuesto 2) o una sal farmacéuticamente aceptable del este.

- [00132]** En algunas modalidades, se administra el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un agonista del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR). En algunas modalidades, el agonista de PPAR es pioglitazona. En algunas modalidades, el agonista de PPAR es rosiglitazone. En algunas modalidades, el agonista de PPAR es elafibranor. En algunas modalidades, el agonista de PPAR es saroglitazar. En algunas modalidades, el agonista de PPAR es lanifibranor. En algunas
- 15 modalidades, el agonista de PPAR es elafibranor. En algunas modalidades, el agonista de PPAR es seladelfar.
- 20

[00133] En algunas modalidades, se administra el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un sujeto de forma parenteral. En algunas modalidades, el inhibidor de pancaspasa es emricasan.

- 25 **[00134]** En algunas modalidades, se administra el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un sujeto de forma parenteral. En algunas modalidades, el inhibidor de galectina-3 es belapectina.

[00135] En algunas modalidades, se administra el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un inhibidor de estearoil Co-A desaturasa. En algunas modalidades, el inhibidor de la estearoil Co-A desaturasa 1 es armacol.

5 **[00136]** En algunas modalidades, se administra el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un antagonista del receptor de quimiocina tipo 2 y 5 (quimiocina CCR2/CCR5). En algunas modalidades, el agonista de quimiocina CCR2/CCR5 es cenicriviroc.

10 **[00137]** En algunas modalidades, se administra el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un sujeto de forma parenteral. En algunas modalidades, el antioxidante es vitamina E.

[00138] En algunas modalidades, el compuesto 1 se coadministra con un fármaco para reducir el colesterol. En algunas modalidades, el fármaco para reducir el colesterol es una estatina. En algunas de dichas modalidades, la estatina es atorvastatina, simvastatina o rosuvastatina.

Artículos de elaboración y kits

15 **[0139]** La presente divulgación proporciona además artículos de elaboración que comprenden un compuesto, o una sal de este, una composición descrita en este documento, o una o más dosis unitarias descritas en este documento en un envase adecuado. En determinadas modalidades, el artículo de elaboración es para usar en cualquiera de los métodos descritos en este documento. Los envases adecuados (por ejemplo, contenedores) son
20 conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales, recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles y similares. Un artículo de elaboración puede además esterilizarse y/o sellarse.

[0140] La presente divulgación proporciona además kits para llevar a cabo los métodos de la presente divulgación, que comprenden el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente
25 aceptable de este, o una composición que comprende el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Los kits pueden usarse para uno o más de los usos descritos en este documento y, en consecuencia, pueden contener instrucciones para el tratamiento como se describe en este documento.

30 **[0141]** Los kits suelen incluir un embalaje adecuado. Los kits pueden comprender uno o más recipientes que comprenden el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[0142] Los kits pueden ser formulaciones unitarias, empaques a granel (por ejemplo,

empaques de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Por ejemplo, se pueden proporcionar kits que contengan dosis suficientes del compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y/o un compuesto farmacéuticamente activo útil para una enfermedad detallada en este documento para proporcionar tratamiento efectivo de un individuo durante un período extendido, tal como cualquiera de una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses o más. Los kits también pueden incluir múltiples dosis unitarias del compuesto e instrucciones para su uso y pueden envasarse en cantidades suficientes para su almacenamiento y el uso en farmacias (por ejemplo, farmacias de hospitales y farmacias que ofrecen formulaciones magistrales).

[0143] Los kits pueden incluir opcionalmente un conjunto de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, aunque también son aceptables medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquete magnético o disco óptico) que contengan instrucciones, en relación con el uso de uno o más componentes de los métodos de la presente divulgación. Las instrucciones incluidas con el kit generalmente incluyen información sobre los componentes y su administración a un individuo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ensayo de dosis única ascendente del compuesto 1 en sujetos humanos sanos

Métodos

[0144] Se realizó un ensayo clínico de dosis única ascendente del Compuesto 1 (sal potásica). Se aleatorizaron cuatro grupos de 8 participantes sanos para la recepción de Compuesto 1 (cápsula de 3 mg, 10 mg, 30 mg o 60 mg) o cantidad equivalente de placebo en una relación 3:1 (n=6 activo y n=2 placebo) y se les administraron una vez al día en ayunas el día 1 del estudio. Los niveles plasmáticos del Compuesto 1 y los biomarcadores de PD se determinaron antes de la dosis y en varios momentos posteriores a la dosis.

[0145] Monitoreo de eventos adversos (AE), pruebas de laboratorio clínico de rutina (incluidas pruebas del eje tiroideo [hormona tiroidea libre y total triyodotironina (T3), hormona tiroidea libre y total tiroxina (T4), hormona estimulante de la tiroides (TSH)] biomarcadores cardíacos [CK-MB , troponina I] y bioquímica hepática), se evaluaron constantes vitales intensivas, telemetría cardíaca y electrocardiogramas durante todo el estudio. Las concentraciones del compuesto 1 en plasma y orina se determinaron mediante un ensayo

validado de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem.

[0146] Se recogieron muestras de plasma para determinar la concentración del Compuesto 1 y muestreo de PK antes de la dosis y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración de una dosis única de la medicación del estudio (placebo o compuesto). Se recogieron muestras de orina para determinar la concentración del Compuesto 1 y el muestreo de PK antes de la dosis y en los siguientes momentos: 0-6 horas, 6-12 horas, 12-24 horas y 24-48 horas. Los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante métodos no compartimentales utilizando Phoenix® WinNonlin® (Certara, LP, Princeton, NJ). Las concentraciones de biomarcadores farmacodinámicos (PD) en suero, apolipoproteína B (Apo B) y globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) se midieron mediante un inmunoensayo y los lípidos séricos se determinaron mediante espectrofotometría.

[0147] El muestreo de PD se realizó antes de la dosis y 48 horas y 72 horas después de la dosis. El cambio porcentual desde el inicio para los marcadores de PD se calculó utilizando un modelo ANCOVA con el cambio porcentual desde el inicio como variable dependiente, el grupo de tratamiento como efecto fijo y el inicio como covariable. Los análisis utilizaron datos observados únicamente sin imputación de datos faltantes.

Resultados

Monitoreo de eventos adversos emergentes del tratamiento

[0148] Todos los eventos adversos fueron de gravedad leve o moderada y en gran medida no estuvieron relacionados con el fármaco del estudio. No se informaron AE relacionados con el corazón (p. ej., taquicardia, arritmias) y no se observaron cambios notables en las constantes vitales o los parámetros del ECG (consulte la Tabla 1).

Tabla 1; Monitoreo de seguridad en varias dosis del compuesto 1

	Placebo (n=8)	3 mg Comp. 2 (n=6)	10 mg Comp. 2 (n=6)	30 mg Comp. 2 (n=6)	60 mg Comp. 2 (n=6)
Cualquier AE, todos los grados CTCAE	1 (12,5%)	2 (33,3%)	0	2 (33,3%)	0
CTCAE Grado 1	0	0	0	1 (16,7%)	0

CTCAE Grado 2	0	0	0	1 (16,7%)	0
CTCAE Grado 3 o superior	0	0	0	0	0
AE graves	0	0	0	0	0
AE por relación con el fármaco					
No relacionado	1 (12,5%)	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)	0
Poco probable que esté relacionado	0	0	0	0	0
Posiblemente relacionado	0	0	0	1 (16,7 %)*	0
Relacionado	0	0	0	0	0

*Un sujeto informó dolor de cabeza el día 1 y el día 3 que se resolvió espontáneamente, y dolor pleurítico (axila izquierda) el día 2 que duró unas horas y se resolvió después de una dosis (1000 mg) de paracetamol.

Seguridad y monitorización del eje tiroideo

- 5 **[0149]** Las frecuencias cardíacas permanecieron estables y dentro del rango normal durante 24 horas después de la dosificación del Compuesto 1, siguiendo un patrón similar al observado en el grupo de placebo. Los niveles de TSH, T3 libre y T4 libre se mantuvieron dentro del rango normal. Ningún sujeto experimentó aumentos en ALT más de 2 veces mayores que el límite superior normal (ULN); ningún sujeto presentó niveles de bilirrubina por encima del rango
- 10 normal. Además, no se observaron cambios notables en los biomarcadores cardíacos (troponina I, CK-MB) ni en otras pruebas de seguridad clínica.

Farmacocinética

- 15 **[0150]** El compuesto 1 se absorbió con baja variabilidad (%CV $\leq$ 33%) en condiciones de ayuno. Las exposiciones (AUC, C_{máx}) fueron aproximadamente proporcionales a la dosis. La semivida del Compuesto 1 osciló entre 13,8 y 17,3 h, lo que respalda la administración de dosis una vez al día. Se determinó una excreción renal mínima en todas las dosis. Véanse la Tabla

2, FIG. 1, FIG. 2.

Tabla 2: Resultados farmacocinéticos

Dosis del compuesto 1	AUC _{inf} (h*ng/mL)	C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (h)	t _{1/2} (h)	f _e (% dosis, orina)
3 mg (n=6)	4060 (16,6)	217 (13,9)	4,00 (3,00-4,00)	17,3 (13,8 – 20,1)	2,95 (62)
10 mg (n=6)	8110 (23,9)	614 (29,0)	4,00 (3,00-4,03)	14,4 (11,5 – 16,2)	2,05 (74)
30 mg (n=6)	33 000 (33,0)	1800 (23,7)	4,00 (3,00-6,00)	15,7 (11,3 – 23,1)	1,78 (35)
60 mg (n=6)	50 000 (31,4)	3300 (33,2)	4,00 (3,00-4,00)	13,8 (10,5-16,9)	1,53 (53)

Los parámetros se presentan con 3 cifras significativas como media (% CV), excepto T_{máx} y t_{1/2} que se presentan como mediana (rango mínimo-máximo). La f_e es la fracción de dosis excretada en la orina como Compuesto 1 no modificado.

Farmacodinámica

[0151] Se muestra el cambio porcentual medio en la globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) y la apolipoproteína B (Apo B) en el Día 3 después de una dosis única del Compuesto 1 en el Día 1 del estudio en la FIG. 3 y la FIG. 4, respectivamente. El cambio porcentual medio se refiere a la media de mínimos cuadrados (LSM) del modelo ANCOVA y al error estándar (SE). Valor de p frente a placebo: *<0,05; **<0,01; ***<0,001; ****<0,0001. Se observaron aumentos significativos en SHBG después de dosis únicas de ≥ 10 mg del Compuesto 1 en relación con el placebo. Se observaron disminuciones dependientes de la dosis en LDL-c, colesterol total y Apo-B el día 3 después de la administración de una dosis única del Compuesto 1 con resultados similares el día 4. No se observaron cambios significativos en los niveles de triglicéridos después de una dosis única del Compuesto 1 (ver Tabla 3).

Tabla 3: Cambios en los marcadores de PD, día 3

	Placebo (PBO) (n=8)	3 mg (n=6)	10 mg (n=6)	30 mg (n=6)	60 mg (n=6)

SHGB					
Valor basal (nmol/L)	35,0 (17,97)	46,7 (26,30)	55,0 (20,63)	26,0 (11,19)	39,3 (31,97)
Cambio (nmol/L)	-0,77 (2,17)	0,20 (2,51)	15,8 (2,61)	6,0 (2,6)	5,05 (2,49)
% cambio LSM	-3,8 (3,91)	6,3 (4,52)	31,3 (4,69)	16,5 (4,67)	13,8 (4,48)
Valor de p frente a PBO	-	0,11	<0,0001	0,0023	0,0064
LDL-c					
Valor basal (nmol/L)	106,1 (36,06)	137,5 (17,4)	133,7 (18,2)	123,3 (23,55)	125,2 (45,96)
Cambio (nmol/L)	5,8 (3,44)	-3,98 (3,39)	0,68 (3,34)	-15,7 (3,32)	N/A
% cambio LSM	5,6 (2,85)	-3,1 (2,80)	0,70 (2,76)	-12,5 (2,75)	N/A
Valor de p frente a PBO	-	0,048	0,24	0,0002	N/A
HDL-c					
Valor basal (nmol/L)	45,4 (11,40)	51,0 (22,53)	63,7 (23,55)	49,5 (7,82)	48,2 (13,93)
Cambio (nmol/L)	0,29 (0,93)	0,87 (0,91)	-1,1 (0,96)	-6,1 (0,91)	N/A
% cambio LSM	1,7 (1,77)	2,4 (1,73)	-1,0 (1,83)	-12,1 (1,74)	N/A
Valor de p frente a PBO	-	0,78	0,3027	<0,0001	N/A
TC					
Valor basal (nmol/L)	171,7 (45,05)	216,5 (29,87)	217,7 (38,10)	196,2 (31,2)	191,2 (51,68)
Cambio (nmol/L)	2,3 (4,73)	-1,85 (4,59)	-1,93 (4,61)	-24,14 (4,52)	N/A
% cambio LSM	1,6 (2,15)	-0,88 (2,09)	-0,84 (2,09)	-11,84 (2,06)	N/A
Valor de p frente a PBO	-	0,44	0,45	0,0002	N/A
Apo B					
Valor basal	86,7 (23,18)	113,5	105,8 (9,26)	101,2	92,3 (24,9)

(nmol/L)		(20,06)		(15,89)	
Cambio (nmol/L)	3,8 (2,72)	-1,5 (3,14)	-5,6 (3,0)	-11,5 (2,97)	-13,9 (3,0)
% cambio LSM	5,5 (2,63)	-2,7 (3,04)	-6,0 (2,91)	-11,0 (2,9)	-15,75 (2,91)
Valor de p frente a PBO	-	0,064	0,0081	0,0003	<0,0001

Conclusiones

[0152] Las dosis únicas ascendentes del Compuesto 1 hasta 60 mg fueron en general seguras y bien toleradas y exhibieron exposiciones plasmáticas lineales y proporcionales a la dosis con baja variabilidad. La semivida fue de >13 horas en todos los niveles de dosis única, lo que respalda la dosificación oral una vez al día. La excreción renal del Compuesto 1 inalterado fue mínima, lo que indica que la eliminación renal es una vía menor.

[0153] Se observaron efectos dependientes de la dosis significativos sobre SHBG, Apo B y LDL-c después de una dosis única del Compuesto 1, lo que indica el potencial de eficacia. En relación con la dosis eficaz del Compuesto 1 en modelos preclínicos (el AUC umbral de 3320 ng*h/ml logró una mejora histológica significativa en un modelo de ratón de NASH), se lograron niveles de exposición suficientes en sujetos humanos en todas las dosis del Compuesto 1.

[0154] Los resultados de seguridad, PK y PD respaldan el desarrollo continuo del Compuesto 1 e indican que es muy adecuado para la coformulación con otros agentes orales de NASH de molécula pequeña como una combinación de dosis fija oral, una vez al día.

Ejemplo 2: Ensayo de dosis ascendiente múltiple del Compuesto 1 en sujetos humanos sanos

[0155] Se realizó un ensayo clínico de dosis múltiples ascendentes del Compuesto 1. Se aleatorizaron cuatro grupos de 8 participantes sanos para la recepción de Compuesto 1 (cápsula de 1 mg, 3 mg, 6 mg o 10 mg) o cantidad equivalente de placebo en una relación 3:1 (n=6 activo y n=2 placebo) y se les administraron una vez al día en ayunas durante 14 días. Los niveles plasmáticos del Compuesto 1 y los biomarcadores de EP se determinaron antes de la dosis y en varios momentos posteriores a la dosis.

[0156] Se evaluaron el seguimiento de eventos adversos (AE) (Tabla 4), evaluación de laboratorio clínico de rutina (lo que incluye la evaluación de eje tiroideo [hormona triyodotironina tiroidea (T3) total y libre, hormona tiroxina tiroidea (T4) total y libre, hormona estimulante de la

tiroides (TSH)], biomarcadores cardíacos [CK-MB, troponina I] y características bioquímicas hepáticas) (FIG. 5, FIG. 6), constantes vitales, telemetría cardíaca y electrocardiograma durante el estudio. Las concentraciones de Compuesto 1 se determinaron con un ensayo de espectrometría de masa y cromatografía líquida validado.

- 5 **[0157]** Se recogieron muestras de plasma para la concentración del Compuesto 1 y muestreo de farmacocinética antes de la dosis y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la primera dosis, antes de la dosis los días 3, 4, 5, 8, 11 y 13 de administración de dosis, y antes de la dosis y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de 14 días de administración una vez al día de medicación del estudio (placebo o compuesto). (Vea la Tabla 5, FIG. 7.) Se
- 10 estimaron los parámetros de PK mediante métodos no compartimentales con Phoenix® WinNonlin® (Certara, LP, Princeton, NJ). Las concentraciones de biomarcadores farmacodinámicos (PD) en suero, apolipoproteína B (Apo B) y globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG) se midieron mediante un inmunoensayo y los lípidos séricos se determinaron mediante espectrofotometría.
- 15 **[0158]** También se realizó muestreo PD. El cambio porcentual desde el inicio para los marcadores de PD se calculó utilizando un modelo ANCOVA con el cambio porcentual desde el inicio como variable dependiente, el grupo de tratamiento como efecto fijo y el inicio como covariable. Los análisis utilizaron datos observados únicamente sin imputación de datos faltantes. Los datos de PD del día 15 del estudio se muestran en la FIG. 8.

20 *Resultados y conclusiones*

Seguridad

Tabla 4: Seguridad y efectos adversos

Incidencia de AE en el sujeto por categoría	Placebo (N=6) n (%)	3 mg (N=6) n (%)	6 mg (N = 6) n (%)	10 mg (N=6) n (%)
Cualquier AE, todos los grados CTCAE	0	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)
Grado 1	0	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)
Grado 2 o superior	0	0	0	0
AE graves	0	0	0	0
AE por relación con el fármaco				

No relacionado	0	1 (16,7)	0	2 (33,3)
Poco probable que esté relacionado	0	0	0	0
Posiblemente relacionado	0	0	1 (16,7)	0
Relacionado	0	0	0	0

*Se informó mareos en un sujeto;

CTCAE = criterios de terminología común para eventos adversos, AE = evento adverso; los eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) son aquellos que ocurren en o después del momento de la primera dosis del fármaco del estudio; la gravedad de los eventos adversos

5 se clasificó según CTCAE versión 5.

La administración diaria de dosis de 14 días de placebo o del Compuesto 1 hasta 10 mg fue en general bien tolerada. No se cumplieron criterios de interrupción del estudio ni criterios de interrupción del aumento de dosis. Todos los AE fueron de Grado 1 y la mayoría se consideró no relacionado con el fármaco del estudio. Todos los sujetos asignados al azar al Compuesto 1 completaron el estudio sin interrupción del fármaco del estudio. La frecuencia cardíaca y la presión arterial se mantuvieron estables durante todo el estudio. La T4 libre disminuyó de forma dependiente de la dosis sin cambios claros en la TSH o la T3 libre. Los cambios en T4 fueron asintomáticos y no se consideraron clínicamente significativos, lo que sugiere una modulación periférica de la hormona tiroidea que conduce a una disminución de la T4 libre sin cambios en la T3 o la TSH.

[0159] Los valores medios de ALT fueron similares en todos los grupos y no fueron significativamente diferentes del placebo; ningún sujeto tratado tuvo un aumento de ALT a ≥ 2 x ULN. Se observaron aumentos de GGT dependientes de la dosis con valores por debajo de ULN en los pacientes tratados. Se observaron aumentos de testosterona total dependientes de la dosis, pero no se identificaron cambios significativos en los niveles libres.

[0160] No se identificaron cambios notables en los ECG, biomarcadores cardíacos u otras pruebas de laboratorio clínico.

Farmacocinética y farmacodinamia

Tabla 5: Farmacocinética

Parámetro PK del día 14	1 mg, una vez al día	3 mg, una vez al día N=6	6 mg, una vez al día N=6	10 mg una vez al día N=6
AUC _{tau} (h.ng/mL) (media, % CV)	1090 (15,7)	3600 (26,9)	8310 (44,4)	10 600 (21,1)
C _{máx} (ng/mL) (media, %CV)	80,3 (20,0)	291 (30,9)	699 (35,1)	996 (18,0)
C _{tau} (ng/mL) (media, %CV)	25,7 (28,6)	77,9 (37,6)	175 (64,7)	196 (38,0)
t _{1/2} (h) (mediana, mín.-máx.)	19,5 (17,0- 23,8)	16,0 (14,1 – 19,6)	15,8 (12,7 – 17,6)	15,4 (13,1-18,5)

[0161] Los datos farmacocinéticos indicaron una buena biodisponibilidad oral con una baja variabilidad farmacocinética. Múltiples dosis del Compuesto 1 condujeron a aumentos significativos y dependientes de la dosis en SHBG, incluso a una dosis baja de 3 mg una vez al día. Se observaron reducciones en el colesterol total, LDL-c, Apo B y triglicéridos en todos los niveles de dosis del Compuesto 1 con reducciones significativas observadas el día 15 en la cohorte de dosis de 10 mg. El HDL-c no cambió significativamente hacia el día 15. Estos resultados respaldan que una dosis baja una vez al día del Compuesto 1 es eficaz.

Ejemplo 3: Estudios de interacción fármaco-fármaco con el Compuesto 1 en seres humanos sanos

[0162] Los estudios in vitro indicaron que el Compuesto 1 tiene potencial para la inhibición

de primer paso de los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) 1B1/1B3 y la inhibición intestinal de los transportadores de la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) (OATP1B1 IC₅₀ = 2,01 micromolar; OATP1B3 IC₅₀ = 0,71 micromolar; BCRP IC₅₀ = 9,37 micromolares). El efecto del Compuesto 1 sobre la farmacocinética de rosuvastatina (ROS) coadministrada, un fármaco antihiperlipidémico y un sustrato de OATP y BCRP, en participantes sanos, se determina administrando el Compuesto 1 y ROS como se describe en la Tabla 6, en combinación con el muestreo de PK.

Tabla 6: Coadministración del Compuesto 1 con Rosuvastatina (ROS)

Día del estudio	1	2	3-8	9	10-11	12
Cohorte 1 (n=10)	Dosis única de 10 mg de ROS PO	Sin tratamiento	Hasta 90 mg de compuesto 1, una vez al día PO	Dosis única de hasta 90 mg Compuesto 1 + dosis única de 10 mg de ROS PO	Sin tratamiento	Alta clínica

PO = por vía oral; QD = una vez al día

Además, el Compuesto 2 es un inhibidor de los transportadores expresados intestinalmente glicoproteína P (P-gp) y BCRP (P-gp IC₅₀ = 3,92 micromolar; BCRP IC₅₀ = 4,39 micromolar). Según estudios in vitro, la inhibición de estos transportadores por el Compuesto 2 tiene el potencial de aumentar la absorción del Compuesto 1 coadministrado. Por lo tanto, se ha llevado a cabo un estudio de interacción farmacológica (DDI) para evaluar el potencial del Compuesto 2 para mejorar la absorción del Compuesto 1 mediante la inhibición de P-gp intestinal y BCRP, como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7: Coadministración del Compuesto 1 y Compuesto 2

Día del estudio	1	2-6	7-12	13	14-16	17
Cohorte 2	dosis única de hasta 90 mg de Compuesto	Sin tratamiento	15 mg de compuesto 2 una vez al día por vía oral	Dosis única de hasta 90 mg del Compuesto 1 + Dosis única	Sin tratamiento	Alta clínica

	1 PO			de 15 mg del Compuesto 2		
--	------	--	--	-----------------------------	--	--

Ejemplo 4: Efecto de los alimentos sobre el Compuesto 1 en seres humanos sanos

[0164] El efecto de los alimentos sobre la absorción y la farmacocinética del Compuesto 1 en participantes sanos se determina administrando el Compuesto 1 durante los estados de alimentación y de ayuno, como se describe en la Tabla 8, en combinación con el muestreo de PK.

Tabla 8: Estudios de efectos de los alimentos

Período de estudio / Día de estudio	Período 1/Día 1	Días 2 a 8	Período 2/Día 9	Días 10 a 11	Día 12
Cohorte 3 Secuencia A (n=4)	Hasta 90 mg de Compuesto 1 PO (en ayunas)	Lavado	Hasta 90 mg de compuesto 1 (alimentados)	Sin tratamiento	Alta clínica
Secuencia cohorte 3 B (n=4)	Hasta 90 mg de Compuesto 1 PO (alimentación)	Lavado	Hasta 90 mg de Compuesto 1 PO (en ayunas)	Sin tratamiento	Alta clínica

[0165] Los participantes se someten a un ayuno nocturno (sin alimentos ni líquidos, excepto agua, durante al menos 10 horas antes de la administración de dosis). El día 9 de la secuencia A y el día 1 de la secuencia B, se proporciona un desayuno rico en grasas y calorías que contiene ~1000 kcal y entre un 45 % y un 55 % de grasa 30 minutos antes de la administración del fármaco del estudio. El fármaco del estudio se administra dentro de los 5 minutos posteriores a que los participantes completen (100 % de consumo) el desayuno.

[0166] La monitorización de la seguridad del eje tiroideo y la monitorización de la seguridad cardiovascular se realizan como se describe en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 5: Efectos del Compuesto 1 en el modelo de NASH de ratón

[0167] Los ratones C57BL/6J fueron alimentados con una dieta alta en grasas durante 10 semanas para inducir obesidad (>38 g peso corporal). A ratones obesos se les inyectó por vía intraperitoneal (ip) dos veces por semana durante cuatro semanas 0,5 µl/g de CCl₄ al 25 %

(formulado en aceite de oliva) para inducir fibrosis, y a un grupo de ratones de peso corporal normal se les inyectó ip dos veces por semana durante cuatro semanas con aceite de oliva para que sirva como control sano. Durante el mismo período de administración de dosis, los ratones obesos fueron alimentados por vía oral una vez al día durante 28 días con vehículo o dosis variables del Compuesto 1. En los días de administración de dosis de CCl₄, se administró CCl₄ 4 horas después de la dosificación del compuesto o vehículo. El día 27, todos los animales estuvieron en ayunas durante aproximadamente 16 horas antes de la eutanasia terminal. El día 28, se sacrificaron todos los animales y se analizaron diversos parámetros biológicos. Se midió el peso total del cuerpo, el hígado, el corazón y el cerebro y los cambios en el peso del hígado y del corazón se normalizaron utilizando el peso del cerebro.

[0168] El compuesto 1 redujo significativamente el peso del hígado o cerebro sin efecto sobre el peso corporal total o el peso del corazón o cerebro (FIG. 9). Se analizó la histología del tejido hepático para determinar los efectos del Compuesto 1 sobre la esteatosis, la inflamación y la fibrosis. El compuesto 1 redujo significativamente la esteatosis en todas las dosis probadas, mostró una tendencia en la reducción de la inflamación y redujo significativamente la fibrosis hepática a 3 y 10 mpk (FIG. 10). El compuesto 1 también redujo significativamente el colesterol total en suero, los triglicéridos y la ALT en todas las dosis probadas (FIG. 11).

[0169] Se recolectaron muestras de hígado para el análisis del transcriptoma completo mediante secuenciación de ARN (RNAseq). La preparación y secuenciación de la biblioteca RNAseq (n = 5 por grupo) se realizó utilizando protocolos estándar de Illumina. La alineación de las lecturas de secuenciación se realizó utilizando el software STAR aligner y los recuentos de lecturas se estimaron utilizando RSEM. Los genes expresados diferencialmente (en comparación con los ratones de control NASH tratados con vehículo) se determinaron utilizando el software EdgeR. El análisis de ontología génica se realizó mediante el software Advaita con valores de corte ajustados y cortes de valores de p ajustados >1,5 y <0,05, respectivamente. Las ontologías genéticas se derivaron de la base de datos del Gene Ontology Consortium (26 de abril de 2019) (Ashburner et ál., «Gene ontology: Tool for the unification of biology.» *Nature Genetics* 25(1): 25-9 (2000); Gene Ontology Consortium, «Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation.» *Genome Research* 11: 1425-1433 (2001)). El compuesto 1 tuvo un efecto significativo sobre la expresión de genes asociados con la matriz extracelular de colágeno y la activación de las células estrelladas hepáticas, principalmente al

reducir sus niveles de expresión en relación con los ratones de control de NASH (FIG. 12).

Ejemplo 6: Efecto del pH y del solubilizador sobre la solubilidad del compuesto 1

[0170] Se evaluó la solubilidad del Compuesto 1 (sal de potasio) a varios niveles de pH. La solubilidad del Compuesto 1 en solución acuosa dependía del pH y aumentaba con el pH, como se muestra en la Tabla 9. En presencia de un solubilizante (laurilsulfato de sodio, SLS), la solubilidad del Compuesto 1 mejoró aun más hasta 308 µg/mL en un amortiguador a pH 10,0 + SLS 2 % en peso a 25 °C después de 24 h.

Tabla 9: Efecto del pH y del solubilizante sobre la solubilidad del Compuesto 1. (Valor de pKa aproximado del compuesto 1 = 4,12).

Disolvente	Solubilidad (µg/mL)	
	24 h (sin 2% en peso SLS)	24 h (con 2 % en peso SLS)
HCl 0,1 N	<0,03	5,7
Amortiguador pH 2,0	<0,07	5,5
Amortiguador pH 4,0	<0,07	10,0
Amortiguador pH 6,0	2,2	42,3
Amortiguador pH 8,0	10,8	301,9
Amortiguador pH 10,0	10,2	308,2

Ejemplo 7: Formulaciones del compuesto 1, farmacocinética, efecto del alimento en perros beagle

[0171] Para determinar el efecto del solubilizante (SLS) sobre la absorción del Compuesto 1, se formularon 50 mg (basados en ácido libre) del Compuesto 1 en una cápsula con o sin 5% en peso de SLS (ver Tabla 10) y se administraron a perros beagle en ayunas pretratados con pentagastrina (6 µg/kg, administrados mediante inyección intramuscular 30 ± 2 minutos antes de la administración del Compuesto 1). La concentración plasmática del Compuesto 1 se midió durante 24 horas (ver FIG. 13). La formulación con 5 % en peso de SLS aumentó la exposición ($C_{máx}$, AUC) del Compuesto 1 en más del 70 % (ver Tabla 11).

Tabla 10: Composición de formulaciones de cápsulas del Compuesto 1 de 50 mg.

	Formulación 1 (PO1) (% en	Formulación 2 (PO2) (% en peso)
--	------------------------------	------------------------------------

	peso)	
Compuesto 1	18,25	18,25
Celulosa microcristalina PH-102	51,16	47,83
Manitol 200SD	25,58	23,92
Laurilsulfato de sodio SLS fino	0	5,0
Croscarmelosa sódica	3,0	3,0
Dióxido de sílice coloidal Aerosil 200 Pharma	1,0	1,0
Estearato de magnesio LIGAMED MF-2-V	1,0	1,0

Tabla 11: Farmacocinética del Compuesto 1 después de la administración de cápsulas de 50 mg en perros beagle (n=5).

	Formulación 1	Formulación 2
C _{máx} (ng/mL)	572	1010
T _{máx} (h)	3,60	3,20
t _{1/2} (h)	4,46	4,11
AUC _{0-final} (ng*h/mL)	3420	6210
AUC _{0-inf} (ng*h/mL)	3700	6360

- 5 **[0172]** Para determinar el efecto del pH sobre el rendimiento de la PK, los perros beagle se dividieron en dos grupos (n=3 por grupo). Para el grupo 1, los perros fueron pretratados con pentagastrina (6 µg/kg, inyección intramuscular 30 ± 2 minutos antes de la administración del Compuesto 1). Para el grupo 2, los perros fueron pretratados con famotidina (2 comprimidos, 20 mg/comprimido, administración oral 180 ± 10 minutos antes de la administración del
- 10 Compuesto 1). Se administró el Compuesto 1 (cápsula de 10 mg, SLS al 5 %) y se controlaron las concentraciones plasmáticas del Compuesto 1 durante 24 h y se representan en la FIG. 14. Se produjo un efecto mínimo del pH en perros en las condiciones del estudio.
- [0173]** Para determinar el efecto del alimento en el rendimiento farmacocinético, los perros

beagle se dividieron en dos grupos (n=3 por grupo). Para el grupo en ayunas, los perros estuvieron en ayunas durante la noche hasta las 4 horas posteriores a la administración de la dosis. Para el grupo alimentado, los perros fueron alimentados con alimentos ricos en grasas 30 minutos antes de la administración. Se controlaron las concentraciones plasmáticas del Compuesto 1 durante 24 h. Se administró el Compuesto 1 (cápsula de 10 mg, SLS al 5 %) y se controlaron las concentraciones plasmáticas del Compuesto 1 durante 24 h y se representan en la FIG. 15. La ingesta de alimentos retrasó $T_{\text{máx}}$ del Compuesto 1, pero no tuvo un impacto en la exposición al plasma.

Ejemplo 8. Producción de sal potásica del Compuesto 1

[0174] Se cargaron (E)-(2-ciano-2-(2-(3,5-dicloro-4-((4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-il)oxi)fenil)hidraziniliden)acetil)carbamato de etilo (7,4 kg, 0,99-1,01X), acetato de potasio (7,4 kg, 0,95-1,00X) y DMAc (41 kg, 5,6-6,0X) en un reactor GL de 500 L. La mezcla resultante se mantuvo a 80 a 90 °C durante 12 a 16 h. La mezcla se ajustó a 20 a 30 °C. Se añadió una solución de KOH (0,85 kg, 0,11-0,17 X) en agua de proceso (8 kg, 1,0-1,5 X) a 20 a 30 °C durante 1 a 2 h. La mezcla se agitó a 20 a 30 °C durante 1 a 2 h. Se añadió agua de proceso (39 kg, 5,0-5,5X) a 20-30 °C durante 4 a 6 h. La mezcla se agitó a 20 a 30 °C durante 2 a 3 h. La mezcla resultante se centrifugó con una centrífuga de acero inoxidable. La torta húmeda se enjuagó con agua de proceso dos veces (18+20 kg, 2-3X). Se cargó la torta húmeda y el agua de proceso (38 kg, 5,0-6,0X) en el reactor GL de 500 L. La mezcla se agitó a 20 a 30 °C durante 2 a 3 h. La mezcla resultante se centrifugó con una centrífuga de acero inoxidable. La torta húmeda se enjuagó con agua de proceso dos veces (18+22 kg, 2-3X) y se secó en un secador de acero inoxidable a presión reducida a 55 a 65 °C para obtener la sal potásica en bruto del Compuesto 1 (5,45 kg, pureza: 98,4 %; ensayo: 95,9 %; rendimiento: 72 %).

[0175] La sal de potasio en bruto del Compuesto 1 (5,3 kg, 0,99-1,01X) y DMSO (43 kg, 6,0-8,0X) se cargaron en un reactor de 250 GL (R1). La mezcla resultante se mantuvo a 40 a 50 °C durante 0,5 a 1 h para dar una solución transparente. Se añadió acetato de etilo (EA) (22 kg, 4,0-4,5X) a 40 a 50°C durante 1 a 2 h. La mezcla resultante se filtró a través de un filtro en línea y se transfirió a un reactor de 250 GL (R2). Se lavó R1 con DMSO (1,8 kg, 0,2-0,5X) y el material se filtró a través de un filtro en línea y se transfirió a R2. Se ajustó a 40-50°C y se cargó EA (22 kg, 4,0-4,5 X) en R2 a 40-50 °C durante 1 a 2 h. Se cargaron semillas del Compuesto 1 (0,010 kg, 0,001-0,002X) en R2. La mezcla resultante se agitó a 100 °C durante 12 horas. Se cargó

EA (67 kg, 12,0-13,0X) en R2 a 40-50 °C durante 12 a 15 h y se agitó a 40-50 °C durante 2 a 3 h. Se tomaron muestras para análisis (especificaciones: XRPD de torta húmeda: consistente con la forma de referencia A). EA cargados (27 kg, 1,0-5,0X) en R2 a 40 a 50 °C durante 2 h y se agitaron a 40 a 50°C durante 2 a 3 h. Se ajustó R2 a 20 a 30°C durante 2 h y se agitó a 20 a 30 °C durante 4 a 6 h. La mezcla resultante se filtró en un filtro secador de acero inoxidable. La torta húmeda se enjuagó con EA dos veces (16+14 kg, 2-3X). Se cargó EA (36 kg, 6-7X) en el filtro secador de acero inoxidable. Se ajustó a 20 a 30 °C y se agitó a 20 a 30 °C durante 2 a 3 h. La mezcla resultante se filtró en un filtro secador de acero inoxidable. La torta húmeda se enjuagó con EA (16 kg, 2-3X) y se secó mediante un filtro secador de acero inoxidable a presión reducida a 60 a 70°C. El material se tamizó para dar la sal de potasio purificada del Compuesto 1 (4,16 kg , pureza: 99,81 %; ensayo: 97,6 % rendimiento: 80 %). Véase la FIG. 16.

Ejemplo 9. Estudio de detección de sal para el compuesto 1

[0176] Se evaluaron varias formas de sal del Compuesto 1 en función de sus propiedades (incluidas la solubilidad, la estabilidad y la higroscopicidad) en relación con la forma de sal de potasio preparada en el Ejemplo 8 (ver Figura 16, Tabla 12).

Tabla 12: Lista de picos: (Forma A de sal de potasio del Compuesto 1)

Pos. [°2 θ]	Altura [cm]	FWHM izquierda [°2 θ]	Espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
6,16	320,90	0,1023	14,34	37,17
6,78	530,15	0,1023	13,04	61,40
8,49	121,75	0,1023	10,41	14,10
11,35	687,96	0,1023	7,79	79,68
13,51	243,61	0,1279	6,56	28,22
14,44	376,23	0,1279	6,13	43,58
15,76	238,73	0,1279	5,62	27,65
16,81	119,97	0,2047	5,27	13,90
19,77	69,22	0,2047	4,49	8,02
20,51	863,38	0,1535	4,33	100,00
24,63	277,93	0,1279	3,61	32,19
25,97	330,30	0,1279	3,43	38,26

Pos. [°2 θ]	Altura [cm]	FWHM izquierda [°2 θ]	Espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
26,68	131,82	0,1535	3,34	15,27
29,13	370,67	0,1791	3,07	42,93
31,00	53,89	0,3070	2,88	6,24
31,75	87,04	0,1535	2,82	10,08
34,09	86,07	0,1535	2,63	9,97
35,67	146,38	0,2047	2,52	16,95
36,47	73,59	0,2047	2,46	8,52
37,74	93,93	0,1535	2,38	10,88
38,90	88,02	0,2047	2,32	10,20

[0177] Utilizando la forma de ácido libre A (FIG. 17) como material de partida, se realizaron un total de 50 experimentos de selección de sales con 10 formadores de sales y 5 disolventes. Los resultados de la caracterización mostraron que se obtuvo un total de 14 sales en experimentos de selección y reparación de sales, incluida la sal de amonio tipo B/C 1, la sal de L-lisina tipo A/B/C, la sal de magnesio tipo A, la sal de colina tipo A, sal de calcio tipo A, sal de L-arginina tipo A/B, sal de sodio tipo A, sal Tris tipo A/B, sal de dietilamina tipo A y 4 formas del ácido libre, incluido el ácido libre tipo A/B/C/D.

[0178] Con base en los datos de caracterización (usando buena cristalinidad, señal DSC pura, relación molar entera, clase alta de seguridad y polimorfismo simple como criterios), sal de sodio tipo A (FIG. 18, Tabla 13), sal de L-arginina tipo A (FIG. 19) y la sal de magnesio tipo A (FIG. 20) se seleccionaron para la reparación y la evaluación de la solubilidad cinética, con la sal de potasio como referencia en la comparación. Los resultados de la evaluación de solubilidad mostraron que la sal de sodio demostró la mayor solubilidad en agua a temperatura ambiente durante 24 horas (~0,4 mg/mL, similar a la de la sal de potasio en agua a 37 °C). En líquido gástrico simulado (SGF) a 37 °C, la sal de potasio demostró la mayor solubilidad (0,11 mg/mL), seguida de la sal de sodio. En líquido intestinal simulado en estado de ayuno (FaSSIF)

¹ Según la comparación de XRPD, se especuló que la muestra con el nombre de sal de amonio tipo A era una mezcla de tipo D de forma libre y sal de amonio.

a 37 °C, la sal de magnesio mostró la mayor solubilidad (~0,04 mg/mL), seguida por el ácido libre. En líquido intestinal simulado en estado de alimentación (FeSSIF) a 37 °C, se observó una solubilidad similar (~0,02 mg/ml) en las cuatro sales y el ácido libre. Los resultados de XRPD mostraron que, a excepción del ácido libre, se observaron cambios de forma en todas las sales en diferentes medios de prueba.

Tabla 13: Lista de picos: (Forma A de sal sódica del Compuesto 1)

Pos. [°2θ]	Altura [cm]	FWHM izquierda [°2θ]	Espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
5,51	1473,10	0,1279	16,02	100,00
6,99	918,64	0,1535	12,64	62,36
8,47	1446,52	0,1023	10,44	98,20
11,04	112,50	0,1535	8,01	7,64
13,12	810,51	0,1791	6,75	55,02
15,24	895,67	0,1535	5,82	60,80
16,57	1066,13	0,1279	5,35	72,37
17,78	357,33	0,1023	4,99	24,26
20,42	502,33	0,1279	4,35	34,10
21,02	397,74	0,1791	4,23	27,00
22,19	353,84	0,1023	4,01	24,02
23,07	113,00	0,1535	3,86	7,67
25,69	114,50	0,2303	3,47	7,77
27,21	264,78	0,1023	3,28	17,97
27,99	70,75	0,8187	3,19	4,80
28,55	551,84	0,2047	3,13	37,46
29,58	102,40	0,1535	3,02	6,95
31,33	465,57	0,1535	2,86	31,60
32,49	52,21	0,2047	2,76	3,54
33,51	90,30	0,2047	2,67	6,13
34,16	93,36	0,1535	2,62	6,34

[0179] De acuerdo con los resultados de la evaluación de la solubilidad cinética, con mayor solubilidad (en comparación con el ácido libre) y polimorfismo simple como criterios, se seleccionó la sal de sodio anhidra tipo A como candidata para la evaluación de estabilidad fisicoquímica, higroscopicidad y pruebas PLM, y se comparó con la sal de potasio tipo A (Tabla 14). Los resultados de estas pruebas mostraron:

1) Evaluación de la estabilidad fisicoquímica: después del almacenamiento a 60 °C/sellado y 60 °C/75 % de humedad relativa durante 1 y 2 semanas, se observó una disminución menor de la pureza de HPLC (<0,1 % de área) y no se observó ningún cambio de forma para la sal de sodio tipo A.

2) Higroscopicidad: los resultados de la sorción dinámica de vapor (DVS) mostraron que la sal de sodio tipo A era ligeramente higroscópica sin cambios de forma después de la prueba DVS.

3) PLM: La muestra de sal de sodio tipo A estaba formada por cristales irregulares con un tamaño de partícula <20 µm. La comparación de los datos de caracterización y evaluación de la sal de sodio y la sal de potasio se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Resumen de datos de caracterización de sales de sodio y sales de potasio.

Forma cristalina Propiedades	Sal de potasio tipo A	Sal de sodio tipo A
Cristalinidad	Elevado	Elevado
Pérdida de TGA	2,1 % (hasta 300 °C)	1,6 % (hasta 180 °C)
Señal endotérmica DSC, °C (pico)	--	110,9 [#]
Pureza de HPLC, % de área	99,95	99,72
Relación molar (API/ex)	1:1	1:1
Forma especulada	Anhidro	Anhidro
Solubilidad cinética	La solubilidad en agua y SGF a 37 °C fue mayor que en FaSSiF/FeSSiF a 37 °C, hasta ~0,37 mg/mL (concentración de ácido libre).	La solubilidad en agua a temperatura ambiente fue mayor que en SGF/FaSSiF/FeSSiF a 37 °C, hasta ~0,36 mg/mL (concentración de ácido

Forma cristalina Propiedades	Sal de potasio tipo A	Sal de sodio tipo A
		libre).
Higroscopicidad/Absorción de agua al 80 % de humedad relativa/cambio de forma después de DVS	No higroscópico/0,08%/No	Ligeramente higroscópico/0,9%/No
Estabilidad fisicoquímica	Después del almacenamiento a 60 °C/sellado y 60 °C/75 % de humedad relativa durante una y dos semanas, se observó una disminución menor de la pureza de HPLC (<0,1 % de área) y no se observó ningún cambio de forma.	

--: No se detectó ninguna señal térmica evidente antes de la descomposición (se especuló que el punto de fusión era > 350 °C).

#: Se especuló que la endotermia estaba relacionada con la pérdida de disolvente residual o agua y se especuló que el punto de fusión era >350 °C.

5 **Ejemplo 10. Formulación del compuesto 1 utilizado en ensayos clínicos**

[0180] El compuesto es un agonista selectivo del receptor beta de la hormona tiroidea biodisponible por vía oral (THR-β), para el tratamiento de adultos con esteatohepatitis no alcohólica no cirrótica (NASH) de moderada a grave. El compuesto 1 está clasificado como compuesto BCS Clase IV y ha sido formulado como una cápsula de liberación inmediata. Para mejorar la solubilidad intrínseca de la sustancia activa, se aísla el Compuesto 1 como la forma de sal de potasio del principio activo y se usa laurilsulfato de sodio como agente solubilizante en la formulación de liberación inmediata. El producto formulado es una mezcla seca que contiene entre 0,5 y 50 mg del Compuesto 1 (equivalentes de ácido libre) en una cápsula de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) de tamaño 0. Además de un solubilizante, se pueden utilizar otras clases de excipientes como diluyente (como celulosa microcristalina (MCC), manitol, etc.), desintegrante (como croscarmelosa sódica, etc.), deslizante (dióxido de silicio coloidal, etc.) y lubricante (como estearato de magnesio, etc.) también se investigaron y se utilizaron en la formulación del Compuesto 1. La composición de formulación de dosis unitaria cuantitativa de las cápsulas activas se describe en la Tabla 15 a continuación.

20 Tabla 15. Composición del Compuesto 1, Cápsulas, 1 mg, 3 mg, 10 mg y 50 mg

Componente	1 mg		3 mg		10 mg		50 mg	
	Peso/mg	% p/p	Peso/mg	% p/p	Peso/mg	% p/p	Peso/mg	% p/p
Compuesto 1 ^[1]	1,1	1,1	3,3	1,1	10,9	3,6	54,3	18,1
Celulosa microcristalina	59,3	59,3	177,9	59,3	172,7	57,6	143,8	47,9
Manitol	29,6	29,6	88,8	29,6	86,4	28,8	71,9	24,0
Laurilsulfato de sodio	5,0	5,0	15,0	5,0	15,0	5,0	15,0	5,0
Croscarmelosa sódica	3,0	3,0	9,0	3,0	9,0	3,0	9,0	3,0
Dióxido de silicio coloidal	1,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0
Estearato de magnesio	1,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0
Cápsula HPMC, tamaño 0	1 cápsula		1 cápsula		1 cápsula		1 cápsula	
Total	100,0	100,0	300,0	100,0	300,0	100,0	300,0	100,0

^[1] Las concentraciones de 1 mg, 3 mg, 10 mg y 50 mg se basan en ácido libre. El contenido teórico de ácido libre del Compuesto 1 en sal de potasio es del 92,1 % y la cantidad real depende del ensayo de los lotes de sustancia farmacológica utilizados en el producto farmacéutico.

5 **Ejemplo 11. Estudio de formulación de encapsulación directa del Compuesto 1**

[0181] Se llevó a cabo un estudio de formulación de encapsulación directa (DE) del Compuesto 1. Este trabajo incluyó el desarrollo del proceso DE para la preparación de cápsulas de 1 mg, 3 mg, 10 mg, 50 mg y placebo mediante una máquina llenadora de cápsulas automática o semiautomática. Se evaluaron todos los ingredientes, proporciones, peso de relleno, fluidez y uniformidad de la formulación. Los procesos desarrollados son adecuados para la fabricación de productos farmacéuticos del Compuesto 1 para futuros estudios clínicos. Se llevaron a cabo la preparación de lotes de confirmación de prototipos, estudios de estabilidad a corto plazo, confirmación de GMP y fabricación de lotes de demostración de estabilidad para garantizar el éxito de la fabricación de lotes de GMP y su calidad para el uso clínico previsto.

[0182] Durante el estudio de formulación inicial del Compuesto 1, se investigaron los tipos de solubilizante, incluidos solubilizantes tales como Poloxamer 188 y el tensioactivo aniónico

laurilsulfato de sodio (SLS). SLS mostró buena compatibilidad con el Compuesto 1 y aumentó la solubilidad acuosa del Compuesto 1. Se investigó el nivel de SLS entre 1,5 % y 5,0 % p/p. Los datos farmacocinéticos indicaron que el uso de una cierta cantidad de SLS en la formulación mejoró significativamente la biodisponibilidad in vivo. Por lo tanto, del 1,5 % al 5,0 % de SLS era adecuado para un mayor desarrollo de la formulación con el Compuesto 1.

[0183] Se desarrolló un proceso de mezcla eficiente para enfrentar el desafío de la uniformidad de dosis en diferentes niveles de dosis. Para niveles de dosis de 0,5 mg a 10 mg, se desarrolló el proceso de mezcla de cantidades iguales. El compuesto 1 se mezcló inicialmente con la cantidad total de SLS y una cantidad parcial de MCC en cantidades iguales.

Luego, la mezcla se mezcló con los excipientes restantes, se pasó a través de un tamiz y luego se mezcló nuevamente (un proceso de mezcla-tamizado-mezcla). Al combinar el Compuesto 1 junto con excipientes en lugar de solo, se redujo eficientemente la pérdida de rendimiento del Compuesto 1 durante el proceso de combinación. El proceso de mezcla-tamizado-mezcla incorporó eficazmente el Compuesto 1 en dosis bajas con los excipientes de manera uniforme en la formulación con mayores rendimientos, lo que permitió el llenado directo de cápsulas o la formación de comprimidos directos más adelante. Para formulaciones de 10 mg a 50 mg, se usaron procedimientos de mezclado y tamizado similares además del proceso de mezclado de cantidades iguales desarrollado y descrito anteriormente. Los lotes de demostración y los lotes GMP de cada concentración de dosis mostraron que los resultados de uniformidad de la mezcla de las mezclas finales que utilizan este proceso de mezcla cumplen con las especificaciones deseadas del producto.

[0184] El peso de llenado de las cápsulas de las formulaciones que contienen el Compuesto 1 en diferentes dosis y placebos se diseñó para que fuera de 300 mg, porque el volumen de este material puede satisfacer las necesidades del llenado semiautomático con cápsulas n.º 0 según la densidad aparente de las mezclas finales. El llenado semiautomático podría usarse en la etapa clínica temprana, donde solo se necesitan lotes pequeños de productos farmacéuticos clínicos. Además, también se ha desarrollado un proceso de llenado de cápsulas completamente automático para satisfacer las necesidades a gran escala de los estudios clínicos en etapas posteriores.

[0185] Estudios breves de estabilidad en condiciones de estrés a 60 °C/75 % de humedad relativa revelaron que después de dos semanas se formó una impureza de degradación para

una concentración de 3 mg. Posteriormente, se propuso un desecante de gel de sílice para el embalaje y se demostró que era eficaz para mitigar la formación de impurezas.

[0186] La fabricación posterior de estabilidad de demostración y lotes de GMP de 1 mg, 3 mg, 10 mg y 50 mg utilizando el Compuesto 1 GMP se llevaron a cabo de acuerdo con la formulación y el proceso finales. La efectividad del desecante de gel de sílice para minimizar la degradación se evaluó mediante estudios comparativos de estabilidad con o sin desecante incluido en el empaque primario. Los datos de estabilidad demostraron claramente que el envasado con desecante retrasó significativamente la formación de impurezas de degradación en condiciones de 40 °C/75 % de humedad relativa. Por lo tanto, se determinó que el envasado con 1 g de desecante mejora la calidad del producto y aumenta la vida útil del producto.

[0187] ***Ejemplo 12. Evaluación clínica del Compuesto 1 en sujetos sanos con LDL-c elevado***

[0188] Objetivos: Evaluar la seguridad y tolerabilidad generales de múltiples dosis ascendentes del Compuesto 1 en sujetos sanos con LDL-c elevado.

[0189] Objetivos secundarios: Evaluar la PK y PD del Compuesto 1 en sujetos sanos con LDL-c elevado después de múltiples dosis ascendentes del Compuesto 1.

[0190] Criterios de valoración principales: eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE), constantes vitales, parámetros de laboratorio clínico y monitorización de electrocardiograma (ECG).

[0191] Criterios de valoración secundarios: parámetros farmacocinéticos plasmáticos para el compuesto 1, marcadores de PD de la participación del objetivo del agonista de THR- β , incluido LDL-c y otros parámetros lipídicos y globulina de fijación de hormonas sexuales (SHBG).

[0192] Los voluntarios sanos con LDL-c ligeramente elevado fueron asignados aleatoriamente 3:1 al Compuesto 1 (n=6) o placebo (n=2). Los voluntarios asignados al azar al Compuesto 1 recibieron múltiples dosis de 1, 3, 6 o 10 mg del Compuesto 1 una vez al día durante 14 días en la cohorte MAD del estudio.

Resultados

[0193] El Compuesto 1 fue generalmente seguro y bien tolerado con una incidencia similar de AE en todos los grupos de tratamiento del Compuesto 1 y en el placebo. Todos los AE fueron de leves a moderados sin relación aparente con la dosis. Un sujeto de placebo (cohorte de 1 mg) abandonó el estudio antes de tiempo debido a que retiró su consentimiento. Todos los

sujetos del Compuesto 1 completaron el estudio sin interrupciones prematuras. No se cumplieron criterios de interrupción del estudio ni criterios de interrupción del aumento de dosis.

[0194] Bioquímica hepática: los valores de ALT, AST, ALP y bilirrubina total fueron en general similares en todos los grupos de tratamiento. Ningún sujeto que recibió el Compuesto 1 tuvo un aumento de ALT a $\geq 2x$ LSN. No hay evidencia de DILI. Hormona tiroidea: No hay síntomas de hipertiroidismo o hipotiroidismo. Los valores medios de TSH y T3 libre fueron muy variables, pero en general similares entre los grupos. Se observaron disminuciones dependientes de la dosis de T4 libre entre los grupos del Compuesto 1 consistentes con la modulación periférica de la hormona tiroidea observada con otros agonistas de THR-. Otras evaluaciones de laboratorio (p. ej., química clínica, hematología) no mostraron tendencias aparentes

[0195] La dosificación una vez al día del Compuesto 1 a 1, 3, 6 y 10 mg durante 14 días fue en general segura y bien tolerada sin signos ni síntomas clínicos de hipotiroidismo o hipertiroidismo o agonismo de THR- α . El compuesto 1 exhibió una farmacocinética proporcional a la dosis con baja variabilidad y una vida media adecuada para una administración de dosis una vez al día. El compuesto 1 aumentó la SHBG, un marcador clave de la interacción hepática de THR- β , de una manera dependiente de la dosis. El compuesto 1 provocó disminuciones significativas en los niveles de lípidos aterogénicos circulantes, incluidos LDL-c, Apo B, colesterol total y triglicéridos. En conjunto, los datos de la PD indican que la administración del Compuesto 1 condujo a una sólida participación del objetivo de THR- β en el hígado.

[0196] ***Ejemplo 13: Efecto de 12 semanas de tratamientos mono y combinados con el Compuesto 2 y el Compuesto 1 sobre los parámetros metabólicos, la patología hepática y la puntuación de actividad de NAFLD, incluida la etapa de fibrosis, en ratones DIO-NASH machos confirmados por biopsia***

LISTA DE ABREVIATURAS

Acta2	Actina alfa 2 actina suave
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina transaminasa
ANOVA	Análisis de variación
AST	aspartato transaminasa
BW	Pesos corporales

CD146	Molécula de adhesión celular de melanoma
ADNc	ADN complementario
CK18 M30	Citoqueratina 18 M30
Col1a1	Colágeno tipo I alfa 1
DAB	3,3'-Diaminobencidina
Grados	Gen expresado diferencialmente
Dhcr7	7-deshidrocolesterol
DIO	Obesidad inducida por la dieta
DIO-GAN	Obesidad inducida por la dieta Modelo Gubra Amylin NASH
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)
FFPE	Fijado con formalina e incluido en parafina.
	Fragmentos por kilobase de transcripción por millón de lecturas
FPKM	asignadas
FXR	Receptor farnesoide X
g	Fuerza g
Gal-3	Galectina-3
GAN	Gubra Amylin NASH
H&E	Tinción con hematoxilina y eosina.
HDL-c	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
Hmgcs1	Hidroximetilgluteraril-CoA sintasa
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IHC	Inmunohistoquímica
kg	Kilogramo
LDL-c	Colesterol lipoproteína de baja densidad
Lgals3	Galectina-3
mg	Miligramo
NA	No aplica
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica
NAS	Puntuación de actividad de NAFLD
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica

NP-40	Nonidet P-40
PO	Por vía oral (dosis oral)
PSR	Picrosirio rojo
QD	Una vez al día

[0197] *Introducción*

[0198] La esteatohepatitis no alcohólica (NASH), una enfermedad que se manifiesta por inflamación y lesión hepática en el contexto de esteatosis hepática, probablemente requerirá una terapia combinada dirigida a múltiples aspectos de la enfermedad para lograr niveles elevados de resolución de la enfermedad. Los agonistas de molécula pequeña del receptor farnesoide X (FXR), un receptor hormonal nuclear que mantiene la homeostasis de las vías metabólicas, y el receptor beta de la hormona tiroidea (THR- β), un receptor hormonal nuclear que regula las vías metabólicas complementarias al FXR, son en desarrollo para el tratamiento de NASH. El Compuesto 2, un agonista no esteroideo de FXR, y el Compuesto 1, un agonista selectivo de THR- β distribuido en el hígado, se evaluaron solos y en combinación en un modelo de NASH en ratón inducido por dieta.

[0199] *Materiales y métodos*

[0200] *Manejo de animales y diseño de estudios.*

[0201] Se alimentaron ratones macho C57BL/6JRj (n=138) con la dieta Gubra Amylin NASH (GAN) (40 % de grasa, 22 % de fructosa, 2 % de colesterol [D09100310, Research Diets]) o una dieta de alimento magro durante 35 semanas antes de comenzar el tratamiento. Antes del tratamiento, todos los animales se sometieron a una biopsia hepática para confirmación histológica (puntuación de esteatosis ≥ 2 y estadio de fibrosis ≥ 1) y estratificación utilizando la puntuación de actividad (NAS) de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y el sistema de estadificación de la fibrosis. Los ratones obesos inducidos por la dieta con dieta GAN (DIO-GAN) se asignaron al azar a 8 grupos de tratamiento (Tabla 16) según el porcentaje de área de tinción con rojo picrosirius (PSR). Los ratones DIO-GAN (n=16 por grupo) recibieron tratamiento (PO, QD) durante 12 semanas con vehículo (HPMC al 0,5 % + Tween-80 al 0,2 % en amortiguador Tris [50 mM, pH 8]), Compuesto 2 (10 mg /kg), Compuesto 1 (0,3 mg/kg [bajo], 2 mg/kg [medio] o 10 mg/kg [elevado]) o tratamientos combinados del Compuesto 2 con el Compuesto 1 (Combo bajo, Combo medio o Combo elevado). Los controles alimentados con

comida magra dosificada en vehículos sirvieron como controles sanos (n=10). Los ratones se mantuvieron con sus respectivas dietas (GAN o comida magra) durante la duración del estudio. Se realizaron comparaciones entre sujetos (antes y después del tratamiento) para determinar las puntuaciones histopatológicas de la biopsia hepática. Los criterios de valoración cuantitativos terminales incluyeron bioquímica de plasma o hígado, histomorfometría hepática y análisis transcriptómico hepático mediante RNAseq.

Tabla 16. Grupos de tratamiento

Grupo	Dosis	N
Control de vehículos Lean Chow	NA	10
Control de vehículo DIO-GAN	NA	16
Compuesto 2	10 mg/kg	16
Compuesto 1 bajo	0,3 mg/kg	16
Compuesto 1 medio	2 mg/kg	16
Compuesto 1 elevado	10 mg/kg	16
Combo bajo	10 mg/kg Compuesto 2 + 0,3 mg/kg Compuesto 1	16
Combo medio	10 mg/kg Compuesto 2 + 2 mg/kg Compuesto 1	16
Combo elevado	10 mg/kg Compuesto 2 + 10 mg/kg Compuesto 1	16

Grupos de tratamiento asignados al estudio. Los controles del vehículo DIO-GAN administraron el vehículo (0,5 % HPMC + 0,2 % Tween 80 en amortiguador Tris [pH 8]) una vez al día. NA, no aplicable

[0202] *Procesamiento y puntuación de biopsia hepática.*

[0203] Se prepararon biopsias de hígado fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) colocando muestras de hígado en formalina amortiguada neutra al 10 % durante aproximadamente 24 horas y luego se transfirieron a etanol al 70 % antes de almacenarlas a 4 °C. Se colocaron FFPE en la Histokinette para infiltrarse antes de incrustarlos en bloques. Luego se cortaron los tejidos de la biopsia a 3 µm utilizando un microtomo y las secciones se montaron

en portaobjetos. Las secciones de hígado se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la esteatosis, inflamación y abombamiento, y PSR para evaluar la fibrosis. Además, se procesaron portaobjetos para detectar la expresión de proteínas de colágeno tipo I (Col1a1), galectina-3 (Gal-3) y actina del músculo liso (α -SMA) mediante inmunohistoquímica (IHC). Para la tinción H&E, los portaobjetos se incubaron en hematoxilina de Mayer (Dako), se lavaron con agua del grifo, se tiñeron con solución de eosina Y (Sigma-Aldrich), se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos. Para PSR, los portaobjetos se incubaron en hematoxilina de hierro de Weigert (Sigma-Aldrich), se lavaron con agua del grifo, se tiñeron con rojo Picro-sirius (Sigma-Aldrich) y se lavaron dos veces en agua acidificada. Se eliminó el exceso de agua agitando los portaobjetos y luego se deshidrataron con etanol, se aclararon con xileno y se cubrieron. El NAS y el estadio de fibrosis se calificaron como se describió anteriormente (Kleiner et ál. 2005). NAS representa la suma no ponderada de las puntuaciones de esteatosis, inflamación y distensión y rangos de 0 a 8 (Tabla 17); El estadio de fibrosis varía de 0 (sin fibrosis) a 4 (cirrosis). Para la detección de Col1a1, Gal-3 y α -SMA, se realizó IHC mediante procedimientos estándar. Brevemente, después de la recuperación del antígeno y el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario (Col1a1: Southern Biotech, Cat. 1310-01; Gal-3: Biolegend, Cat. 125402; α -SMA: Abcam Cat. Ab124964). El anticuerpo primario se detectó utilizando un conjugado polimérico de anticuerpo enlazador a HRP. El anticuerpo primario se visualizó con DAB como cromógeno. Finalmente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se cubrieron.

Tabla 17: Puntuación histológica de NAS y fibrosis

Característica	Grado	Puntaje
Esteatosis (Porcentaje de hepatocitos con gotitas de lípidos)	<5%	0
	5 a 33%	1
	>33-66 %	2
	>66 %	3
Inflamación lobulillar	Sin focos	0
	<2 focos	1
	2 a 4 focos	2
Degeneración en globo	Ninguno	0

	Pocos	1
	Muchas	2
	células/abombamiento prominente	
Fibrosis	Ninguno	0
	Perisinusoidal o periportal	1
	Perisinusoidal y portal/periportal	2 3
	Fibrosis puente	4
	Cirrosis	

[0204] *Análisis de enzimas hepáticas, lípidos plasmáticos y CK18 M30.*

[0205] Se recogió sangre terminal mediante punción cardíaca de ratones anestesiados con isoflurano (2-3 %), mezclado con anticoagulante y colocado a 4 °C antes de la centrifugación a 3000 xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes de plasma se transfirieron a tubos nuevos y se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. La alanina transaminasa (ALT), la aspartato transaminasa (AST), la fosfatasa alcalina (ALP), los triglicéridos (TG), el colesterol total (TC), las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) fueron medidos utilizando kits comerciales (Roche Diagnostics) en el autoanalizador Cobas c 501 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La citoqueratina 18 M30 (CK18 M30) se midió en plasma utilizando un kit ELISA comercial (Cusabio) según las instrucciones del fabricante.

[0206] *Análisis de lípidos hepáticos.*

[0207] Se homogeneizaron muestras de hígado y se extrajeron TG y TC en NP-40 al 5 % calentando (2x) a 90 °C. Las muestras se centrifugaron y se midió el contenido de TG y TC en el sobrenadante utilizando kits comerciales (Roche Diagnostics) en el autoanalizador Cobas c 501, según las instrucciones del fabricante.

[0208] *Análisis transcriptómico hepático por RNAseq.*

[0209] El tejido se recogió y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento. El ARN se aisló utilizando un kit NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL). Se usó un total de 10 ng a 1 µg de ARN purificado de cada muestra para generar bibliotecas de

ADNc utilizando el kit de preparación de biblioteca direccional de ARN NEBNext Utra II para Illumina (New England Biolabs). Luego se secuenciaron las bibliotecas de ADNc en un NextSeq 500 utilizando el kit de alto rendimiento NextSeq 500/550 V2 (Illumina). Los datos de secuenciación se alinearon con el genoma del ratón utilizando el software Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR). Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando el paquete R DESeq2.

[0210] *Análisis de los niveles mínimos de compuestos plasmáticos.*

[0211] Se recogieron muestras de plasma terminal mediante punción cardíaca aproximadamente 21 a 24 horas después de la última administración del compuesto(s). Las muestras de plasma terminal se analizaron mediante LC-MS/MS de alta resolución utilizando un instrumento Triple Quad 6500+. Se mezclaron 20 µL de muestra de plasma con 200 µL de solución de estándar interno (100 ng/mL de Labetalol + 100 ng/mL de Tolbutamida en acetonitrilo), se agitaron y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min a 4°C. Sobrenadante (100 µL) se transfirió a una placa de muestra, se mezcló con agua (100 µL) y se agitó (800 rpm) durante 10 minutos antes de la inyección (2 µL) en un ACQUITY UPLC BEH C18 de 1,7 µm, 2,1 x 50 mm. columna (Waters) usando un gradiente (Tabla 18) de fase móvil de 0,1% de ácido fórmico en agua (Fase móvil A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (Fase móvil B) a un caudal de 0,6 ml/min. Se usaron dos estándares internos, el estándar 1 (tiempo de retención: 0,87 min) y el estándar 2 (tiempo de retención: 0,96 min) para la cuantificación del Compuesto 2 (tiempo de retención: 0,87 min) y el Compuesto 1 (tiempo de retención: 0,97 min), respectivamente. El estándar interno (tiempo de retención: 0,76 min) se usó para la cuantificación del metabolito glucurónido del Compuesto 2 (tiempo de retención: 0,77 min). Se generaron curvas de calibración (1 a 3000 ng/mL) en una matriz de plasma de ratón (control de vehículo combinado) para cada analito.

Tabla 18: gradiente LC-MS/MS

Tiempo (min)	Fase móvil B (%)
Inicio	35
1,00	98
1,70	98
1,71	35

2,20	Parada
------	--------

[0212] *Resultados*

[0213] *Descripción general del diseño del estudio*

[0214] El modelo Gubra Amylin NASH (DIO-GAN) para la obesidad inducida por la dieta recapitula muchas de las características histopatológicas de la NASH humana (Hansen 2020). Se utilizó el modelo DIO-GAN para evaluar la eficacia del agonista FXR, Compuesto 2, y del agonista THR- β , Compuesto 1, como agentes únicos y en combinación. Para inducir la enfermedad por NASH, los ratones C57BL/6JRj se mantuvieron con una dieta alta en grasas, colesterol y fructosa (dieta GAN) durante >35 semanas. Antes de la intervención terapéutica, se realizó una biopsia a los ratones para evaluar la enfermedad NASH y la gravedad de la fibrosis. Se excluyeron del estudio los ratones con una puntuación de esteatosis <2 y un estadio de fibrosis <1. Luego, los ratones DIO-GAN se asignaron al azar a 8 grupos de tratamiento (n = 16 por grupo) según el porcentaje de área fraccional de la tinción con rojo Picrosirius (PSR) de la biopsia previa al tratamiento, así como la masa de tejido adiposo corporal determinada por ecografía de todo el cuerpo. Imágenes por resonancia magnética (EchoMRI). En los grupos de tratamiento de agente único, el Compuesto 2 se administró por sonda oral una vez al día a una dosis de 10 mg/kg, mientras que el Compuesto 1 se administró por sonda oral una vez al día a niveles de dosis de 0,3 mg/kg (Compuesto 1 bajo), 2 mg/kg (Compuesto 1 medio) o 10 mg/kg (Compuesto 1 elevado). En los grupos de tratamiento combinado, se combinó un nivel de dosis constante del Compuesto 2 (10 mg/kg) con las dosis baja, media y elevada del Compuesto 1 (es decir, Combo bajo, Combo medio, Combo elevado, respectivamente). Los ratones DIO-GAN a los que se les administró vehículo mediante sonda oral una vez al día sirvieron como control. Los ratones fueron tratados durante un total de 12 semanas y se mantuvieron con una dieta GAN durante todo el estudio. Los ratones delgados (n = 10), mantenidos con una dieta normal durante todo el estudio, sirvieron como controles sanos.

[0215] *Efectos del tratamiento sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos y el peso del hígado.*

[0216] El tratamiento con el Compuesto 2 solo y en combinación con el Compuesto 1 (dosis combinadas bajas, combinadas medias y combinadas elevadas) disminuyó el peso corporal durante el estudio (FIG. 30A). Al final del estudio, los grupos de tratamiento del Compuesto 2,

Combo medio y Combo elevado fueron significativamente más bajos que el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 30B). Las disminuciones en el peso corporal no parecieron estar asociadas con disminuciones en la ingesta de alimentos (FIG. 31). Todos los grupos de tratamiento mejoraron significativamente la hepatomegalia (FIG. 32A), y las mayores reducciones en el peso del hígado se observaron en los grupos de tratamiento combinado (Combo medio y Combo elevado). Los cambios en el peso del bazo no fueron significativos (FIG. 32B).

[0217] *Efecto del tratamiento sobre la composición de la masa corporal*

[0218] La composición corporal se determinó al inicio (semana -1) y en la semana 11 del estudio mediante EchoMRI de cuerpo entero para determinar los niveles relativos de tejido magro y graso como porcentaje del peso corporal. Los niveles basales de tejido magro y graso estaban bien equilibrados entre los grupos de tratamiento (FIG. 33A y 33B). El tratamiento con el Compuesto 2 y en combinación con el Compuesto 1 redujo los niveles de tejido graso en la Semana 11 (FIG. 34A). Se observaron aumentos significativos en la masa relativa de tejido magro en los grupos de tratamiento del Compuesto 2 y de combinación (FIG. 34B).

[0219] *Efecto del tratamiento sobre los niveles de lípidos en plasma e hígado*

[0220] Todos los grupos de tratamiento redujeron significativamente el colesterol total en plasma (TC, FIG. 35AA) y las mayores reducciones se observaron con el tratamiento combinado (Combo medio y Combo elevado). Se observaron tendencias similares para TC en el hígado (FIG. 35B). Las reducciones en los colesterolos de lipoproteínas de alta y baja densidad en plasma (HDL-c y LDL-c, respectivamente) fueron consistentes con los efectos observados en la TC. El Compuesto 2 y el Compuesto 1 elevado, así como los tratamientos combinados, redujeron significativamente los triglicéridos en plasma (TG, Figura 36A). Los niveles de TG hepáticos solo se redujeron significativamente en el grupo Combo elevado (FIG. 36B).

[0221] *Efectos del tratamiento sobre las enzimas vivas*

[0222] El tratamiento con agente único con el Compuesto 1 (bajo, medio y elevado) redujo significativamente los niveles de ALT en relación con el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 37A). Los niveles de ALT no se redujeron significativamente con el tratamiento combinado. Los niveles de AST mostraron una tendencia similar a la de ALT aunque ninguno de los grupos de tratamiento fue significativamente diferente del control del vehículo DIO-GAN (FIG. 37B). Los niveles de ALP no fueron significativamente diferentes del control del vehículo DIO-GAN en ninguno de los grupos de tratamiento, aunque la ALP fue numéricamente menor en los grupos

de tratamiento con un solo agente (Compuesto 2, Compuesto 1 bajo y Compuesto 1 medio) y mayor en grupos de tratamientos con Combo medop y Combo elevado en relación con el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 38).

[0223] *Histología hepática*

5 **[0224]** *Puntuación de actividad NAFLD (NAS)*

[0225] Se utilizó la puntuación de actividad NAFLD (NAS) para evaluar los efectos histológicos del tratamiento. NAS se define como la suma no ponderada de las puntuaciones histológicas de esteatosis, inflamación y distensión y puede oscilar entre 0 y 8. Se determinó NAS para cada animal antes (valor basal) y después de 12 semanas de tratamiento al final del estudio. NAS estaba bien equilibrado entre los grupos de tratamiento con un rango de NAS de 5-6 al inicio del estudio en la mayoría de los ratones (FIG. 39A). Después de 12 semanas de tratamiento, NAS mejoró significativamente en la mayoría de los grupos de tratamiento y se observaron las mejoras más profundas con el tratamiento combinado (FIG. 39B). En el grupo de tratamiento con Compuesto 2, el 56 % de los animales mostró una mejora de NAS de ≥ 1 punto, en comparación con el 31 %, 27 % y 62 % en grupos de tratamiento con Compuesto 1 bajo, Compuesto 1 medio y Compuesto 1 elevado, respectivamente (Tabla 19). El tratamiento combinado fue más eficaz: el 69 %, el 81 % y el 100 % de los ratones mostraron una mejora de NAS de ≥ 1 punto en los grupos de tratamiento combinado Combo bajo, Combo medio y Combo elevado, respectivamente. Además, la magnitud de la mejora del NAS fue mayor en los grupos de tratamiento combinado. Mientras que el 0 % de los ratones en el grupo de tratamiento del compuesto 2 mejoraron el NAS en >1 -pt, el 19 %, el 25 % y el 43 % de los ratones en los grupos de combinación Combo bajo, Combo medio y Combo elevado, respectivamente, lograron una mejora del NAS de ≥ 2 -pt. Estos resultados fueron superiores a los grupos de tratamiento con agente único del Compuesto 1, en los que el 0 %, el 7 % y el 25 % de los ratones lograron una mejora de NAS de ≥ 2 puntos en los grupos de dosis de Compuesto 1 bajo, Compuesto 1 medio y Compuesto 1 elevado, respectivamente.

Tabla 19: Efectos del tratamiento sobre la puntuación de actividad de NAFLD (NAS)

Tratamiento (n)	Sin cambios % (n)	Empeoramiento % (n)	Mejora % (n)		
		≥ 1 punto	1 pt	≥ 2 pt	Total

Control no graso (10)	80 % (8)	10 % (1)	10 % (1)	0	10 % (1)
Control DIO- GAN (16)	68,75 % (11)	25 % (4)	6,25 % (1)	0	6,25 % (1)
Compuesto 2 (16)	43,7 % (7)	0	56,25 % (9)	0	56,25 % (9)
Compuesto 1 bajo (16)	56,25 % (9)	12,5 % (2)	31,25 % (5)	0	31,25 % (5)
Compuesto 1 med (15)	73,33 % (11)	0	20 % (3)	6,7 % (1)	26,7 % (4)
Compuesto 1 elevado (16)	31,25 % (5)	6,25 % (1)	37,5 % (6)	25 % (4)	62,5 % (10)
Combo bajo (16)	18,75 % (3)	12,5 % (2)	50 % (8)	18,75 % (3)	68,75 % (11)
Combo medio (16)	18,75 % (3)	0	56,25 % (9)	25 % (4)	81,25 % (13)
Combo elevado (14)	0	0	57,1 % (8)	42,9 % (6)	100 % (14)

[0226] *Esteatosis*

[0227] Las mejoras de NAS fueron impulsadas en gran medida por mayores reducciones en la esteatosis (Tabla 20). En el grupo del Compuesto 2, el 81 % mostró una mejoría en la esteatosis al final del tratamiento, aunque la mejora máxima fue de 1 punto. En los grupos de tratamiento con agente único del Compuesto 1, se observaron aumentos dependientes de la dosis en el porcentaje de ratones que mostraban una mejora de la esteatosis, correspondientes al 31 %, 47 % y 81 % de los ratones en los grupos de dosis de Compuesto 1 bajo, Compuesto 1 medio y Compuesto 1 elevado, respectivamente. En cada grupo de tratamiento con agente único del Compuesto 1, un ratón (es decir, ~6%) mostró una mejora de ≥ 2 puntos en la esteatosis. Por el contrario, el 25 %, el 31 % y el 71 % de los ratones de los grupos de tratamiento Combo bajo, Combo medio y Combo elevado mostraron una mejora de la esteatosis ≥ 2 puntos, respectivamente. Estos efectos fueron respaldados por histomorfometría hepática cuantitativa, que mostró un porcentaje reducido de hepatocitos que contenían gotas de lípidos

(FIG. 40A) y niveles más bajos de lípidos hepáticos (FIG. 40B), así como un tamaño de gotas de lípidos más pequeño (FIG. 41).

Tabla 20: Efectos del tratamiento sobre la puntuación de esteatosis histológica

Tratamiento (n)	Sin cambios % (n)	Mejora % (n)		
		1 pt	≥2 pt	Total
Control no graso (10)	100 % (10)	0	0	0
Control DIO-GAN (16)	81,25 % (13)	18,75 % (3)	0	18,75 % (3)
Compuesto 2 (16)	18,75 % (3)	81,25 % (13)	0	81,25 % (13)
Compuesto 1 bajo (16)	68,75 % (11)	25 % (4)	6,25 % (1)	31,25 % (5)
Compuesto 1 medio (15)	53,33% (8)	40 % (6)	6,7 % (1)	46,7% (7)
Compuesto 1 elevado (16)	18,75 % (3)	75 % (12)	6,25 % (1)	81,25 % (13)
Combo bajo (16)	6,25 % (1)	68,75 % (11)	25 % (4)	93,75 % (15)
Combo medio (16)	6,25 % (1)	62,5 % (10)	31,25 % (5)	93,75 % (15)
Combo elevado (14)	0	28,6 % (4)	72,4 % (10)	100 % (14)

- 5 **[0228]** La combinación del Compuesto 2 y el Compuesto 1 dio como resultado mayores mejoras en la esteatosis hepática. La esteatosis hepática se determinó mediante histología al inicio y al final del tratamiento para cada ratón individual. La Tabla 29 muestra el porcentaje de ratones dentro de cada grupo de tratamiento sin cambios o sin mejora (disminución de 1 punto y ≥2 puntos con respecto al valor basal) en la puntuación de esteatosis. El total representa el
- 10 porcentaje de ratones en cada grupo de tratamiento que muestran una mejora de la esteatosis

de al menos 1 punto con respecto al valor basal.

[0229] *Abombamiento, inflamación y fibrosis*

[0230] El abombamiento hepatocelular, un indicador de apoptosis, se observó con poca frecuencia y ninguno de los tratamientos lo cambió significativamente. CK18 M30, un biomarcador plasmático asociado con la apoptosis, tampoco fue significativamente diferente entre los grupos de tratamiento y el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 42). La inflamación lobulillar no mejoró significativamente con el tratamiento, aunque se observaron mejoras en las puntuaciones de inflamación, aunque con poca frecuencia, en los grupos de tratamiento con Compuesto 1 bajo, Compuesto 1 medio y Compuesto 1 elevado, así como en el grupo de combinación Combo medio (Tabla 21). Para evaluar más a fondo la inflamación, se determinó la expresión de la proteína Galectina-3 (Gal-3), un marcador de infiltración de linfocitos inflamatorios, mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) del hígado. El tratamiento con el Compuesto 2 solo y en combinación con el Compuesto 1 (Combo bajo) dio como resultado niveles más bajos de expresión de Gal-3 en el hígado en relación con el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 43A).

Tabla 21: Efectos del tratamiento sobre la inflamación lobulillar

Tratamiento (n)	Empeoramiento % (n)	Sin cambios % (n)	Mejora % (n)
Control no graso (10)	10 % (1)	80 % (8)	10 % (1)
Control DIO- GAN (16)	31,25 % (5)	68,75 % (11)	0
Compuesto 2 (16)	31,25 % (5)	68,75 % (11)	0
Compuesto 1 bajo (16)	25 % (4)	68,75 % (11)	6,25 % (1)
Compuesto 1 medio (15)	20 % (3)	73,3 % (11)	6,7 % (1)
Compuesto 1	31,25 % (5)	56,25 %	12,5 %

elevado (16)		(9)	(2)
Combo bajo (16)	31,25 % (5)	68,75 % (11)	0
Combo medio (16)	31,25 % (5)	62,5 % (10)	6,25 % (1)
Combo elevado (14)	35,7 % (5)	64,3 % (9)	0

[0231] La inflamación no mejoró significativamente con el tratamiento. La inflamación lobulillar se determinó mediante histología al inicio y al final del tratamiento. La Tabla 30 muestra el porcentaje de ratones dentro de cada grupo de tratamiento con empeoramiento (aumento ≥ 1 punto desde el valor basal), sin cambios o mejora (disminución ≥ 1 punto desde el valor basal) en las puntuaciones de inflamación lobulillar.

[0232] Se observaron mejoras en el estadio de fibrosis con mayor frecuencia en los grupos de tratamiento con agentes combinados en comparación con los grupos con agente único, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas (Tabla 22). Los cambios en la expresión de la proteína Col1a1, determinada mediante tinción IHC del hígado, no fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento. Se observaron reducciones numéricas en α -SMA, un marcador de activación de células estrelladas hepáticas, en el grupo de tratamiento con Compuesto 2, Compuesto 1 bajo y Compuesto 1 medio. Solo se observaron reducciones significativas en el grupo de tratamiento Combo bajo (FIG. 43B).

Tabla 22: Efectos del tratamiento sobre la fibrosis hepática

Tratamiento (n)	Empeoramiento % (n)	Sin cambios % (n)	Mejora % (n)
Control no graso (10)	0	100 % (10)	0
Control DIO-GAN (16)	31,25 % (5)	68,75 % (11)	0
Compuesto 2	37,5 % (6)	56,25 %	6,25 %

(16)		(9)	(1)
Compuesto 1 bajo (16)	31,25 % (5)	62,5 % (10)	6,25 % (1)
Compuesto 1 medio (15)	26,7 % (4)	60 % (9)	13,33 % (2)
Compuesto 1 elevado (16)	25 % (4)	68,75 % (11)	6,25 % (1)
Combo bajo (16)	37,5 % (6)	43,75% (7)	18,75 % (3)
Combo medio (16)	18,75 % (3)	75 % (12)	6,25 % (1)
Combo elevado (14)	21,4 % (3)	50 % (7)	28,6 % (4)

[0233] La mejora de la fibrosis se observa con mayor frecuencia con el tratamiento combinado. El estadio de fibrosis hepática se determinó mediante histología al inicio y al final del tratamiento. La Tabla 31 muestra el porcentaje de ratones dentro de cada grupo de tratamiento con fibrosis que empeora (aumento ≥ 1 etapa desde el inicio), sin cambios o mejora (disminución ≥ 1 etapa desde el inicio).

[0234] *Análisis transcriptómico hepático mediante RNAseq*

[0235] Se procesaron muestras de hígado terminal ($n = 10$) de los grupos de tratamiento para análisis transcriptómico mediante RNAseq. Se identificaron genes expresados diferencialmente (DEG) en comparación con el control del vehículo DIO-GAN. Se identificaron DEG en todos los grupos de tratamiento; la menor cantidad en el grupo de tratamiento Compuesto 1 bajo (987) y la mayor cantidad de DEG en el grupo de tratamiento Combo elevado (3533). La comparación del Compuesto 1 elevado con el Combo elevado indicó que los genes implicados en el metabolismo energético y lipídico se expresaban diferencialmente en mayor medida mediante el tratamiento combinado (FIG. 44). Esto se indica mediante comparación de las pendientes de la línea de identidad (línea de puntos, pendiente = 1) con la línea de regresión lineal (línea continua, pendiente = 0,55) de los valores de cambio. La escualeno epoxidasa (Sqle) y la 7-deshidrocolesterol reductasa (Dhcr7), enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol, se expresaron a niveles significativamente más elevados en los grupos de combinación en relación

con el tratamiento con un solo agente (FIG. 45A y 45B). La hidroximetilglutaril-CoA sintasa (Hmgcs1), una enzima clave en el metabolismo energético, mostró un patrón de expresión similar (FIG. 45C). La esteroil-CoA desaturasa (Scd1), una enzima implicada en el metabolismo de los ácidos grasos, se redujo mediante el tratamiento con el Compuesto 2 y se redujo aun más mediante el tratamiento combinado (FIG. 45D).

[0236] Por último, examinamos la expresión de genes seleccionados asociados con la fibrosis y la inflamación, incluido el colágeno tipo I alfa 1 (Col1a1), la actina alfa 2, actina suave (Acta2), la galectina 3 (Lgals3) y la molécula de adhesión de células de melanoma (CD146). En general, el Compuesto 2 solo y en combinación con el Compuesto 1 redujo significativamente la expresión de estos genes en relación con el control del vehículo DIO-GAN (FIG. 46). Los grupos de tratamiento combinado no fueron significativamente diferentes del tratamiento con el Compuesto 2 solo.

[0237] *Compendio*

[0238] Se utilizó el modelo Gubra-Amylin NASH (DIO-GAN) obeso inducido por dieta de ratón para evaluar la eficacia del Compuesto 2 y el Compuesto 1 como agentes únicos y en combinación sobre los parámetros metabólicos e histopatológicos de NASH y fibrosis. Este modelo se ha caracterizado ampliamente y recapitula muchos aspectos de la NASH humana (Hansen 2020) sin el uso de agentes hepatotóxicos para inducir la enfermedad. En este modelo, los ratones se mantuvieron con una dieta rica en grasas, colesterol y fructosa (dieta GAN) durante >35 semanas. Antes de la intervención terapéutica, se hicieron biopsias a los ratones para evaluar la puntuación de actividad de la NAFLD (NAS) y la gravedad de la fibrosis por histología. En el estudio solo se utilizaron ratones con una puntuación basal de esteatosis > 2 y un estadio de fibrosis > 1. Es importante destacar que este paso de preselección garantiza que en el estudio solo se utilizaron ratones con actividad NAFLD significativa. Además, el conocimiento del NAS inicial permite evaluar las respuestas terapéuticas no solo en relación con el control del vehículo DIO-GAN sino también en relación con los valores basales individuales. Se trataron ratones DIO-GAN con el Compuesto 2 y el Compuesto 1 solos y en combinación durante 12 semanas y se mantuvieron con la dieta GAN durante todo el estudio. Los ratones se trataron con un nivel de dosis única del Compuesto 2, solo o en combinación con 3 niveles de dosis (baja [0,3 mg/kg], media [2 mg/kg] y elevada [10 mg/kg]) del Compuesto 1 para maximizar la capacidad de discernir posibles efectos terapéuticos aditivos.

[0239] La combinación del Compuesto 2 y el Compuesto 1 mostró mayores reducciones en NAS en relación con los tratamientos con agente único, tanto en términos del porcentaje de ratones que mostraron reducción en NAS como de la magnitud de la mejora de NAS. Las mejoras en NAS fueron impulsadas en gran medida por mayores reducciones en la esteatosis, que se asoció con mayores reducciones en el colesterol total y los triglicéridos en plasma e hígado. Los mayores efectos generales observados con el tratamiento combinado no parecieron estar impulsados por una mayor exposición de los fármacos individuales en los grupos de tratamiento combinado (Tabla 23). Además, aunque los cambios en el peso corporal pueden haber contribuido a las mejoras de NAS, las reducciones de peso corporal fueron similares entre los grupos de tratamiento con Compuesto 2 y combinación (Combo bajo y Combo medio), lo que sugiere que la pérdida de peso por sí sola no explica completamente la mayor actividad antiesteatótica del tratamiento combinado. En cambio, el tratamiento combinado tuvo mayores efectos sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y lipídico. Estos resultados sugieren que la combinación del Compuesto 2 y el Compuesto 1 parece tener al menos un efecto aditivo en estas vías y probablemente sea responsable de la mayor actividad antiesteatótica observada.

[0240] La mejora histológica de la inflamación y la fibrosis no fue significativa con el tratamiento. Sin embargo, se observaron pruebas de mejora de la fibrosis, incluido un mayor número de ratones que mostraron una mejora de la fibrosis con la combinación. Además, el análisis transcriptómico identificó marcadores clave de fibrosis e inflamación que se redujeron con el tratamiento combinado. La expresión de estos genes también se redujo con el tratamiento con el Compuesto 2, lo que sugiere que el agonismo de FXR puede ser el principal impulsor del efecto sobre la fibrosis y la inflamación en el nivel de expresión génica. En este caso, el agonismo de FXR puede considerarse complementario al mecanismo más antiesteatótico del agonismo de THR- β . Junto con los mayores efectos antiesteatóticos observados al combinar el Compuesto 2 y el Compuesto 1, estos resultados sugieren que esta combinación podría abordar múltiples aspectos de la enfermedad NASH.

[0241] *Referencias*

[0242] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; «Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring

system for nonalcoholic fatty liver disease.» *Hepatology*. Junio de 2005;41(6):1313-21.

[0243] Hansen, H.H., Ægidius, H.M., Oró, D. Et ál. «Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.» *BMC Gastroenterol* 20, 210 (2020).

5 [0244] Anexo

Tabla 23: Concentraciones mínimas de fármaco en plasma determinadas por LC-MS/MS

Concentración mínima media del analito (SD), ng/mL

Grupo de tratamiento (n)	Compuesto 2	Metabolito glucurónico del compuesto 2	Compuesto 1
Compuesto 2 (16)	7,4 (3,8)	52,7 (26,0)	ND
Compuesto 1 med (15)	ND	ND	135,5 (62,0)
Compuesto 1 elevado (16)	ND	ND	320,0 (189,9)
Combo medio (16)	5,8 (3,5)	53,1 (36,8)	49,5 (42,9)
Combo elevado (14)	3,3 (1,8)	49,0 (23,7)	143,0 (87,9)

[0245] Las muestras de plasma terminal recogidas mediante punción cardíaca 21 a 24 horas después de la dosis de tratamiento final (es decir, valle) se analizaron mediante LC-MS/MS. Los valores representan la media y la desviación estándar (SD). ND, no determinado

[0246] Todas las publicaciones, incluidas patentes, solicitudes de patente y artículos científicos, mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan a este documento mediante esta referencia en su totalidad para todos los fines, en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada publicación individual, incluidas patentes, solicitudes de patente o artículos científicos, se incorpora mediante referencia.

[0247] Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para mayor claridad de comprensión, es evidente para los expertos en la técnica que se practicarán ciertos cambios y modificaciones menores a la luz de la orientación anterior. Por lo tanto, la descripción y los ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.