

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA TERAPIA DE COMBINACIÓN

La presente invención se refiere a combinaciones de nitazoxanida (NTZ) o un derivado de la misma en combinación con un agonista de PPAR para
5 terapia.

[2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil]etanoato, (o nitazoxanida o NTZ), descrito por primera vez en 1975 (Rossignol y Cavier, 1975), demostró ser altamente eficaz contra protozoos anaerobios, helmintos y un amplio espectro de microbios que incluyen bacterias anaerobias y aerobias (Rossignol
10 y Maisonneuve, 1984; Dubreuil, Houcke *et al.*, 1996; Megraud, Occhialini *et al.*, 1998; Fox y Saravolatz, 2005; Pankuch y Appelbaum, 2006; Finegold, Molitoris *et al.*, 2009). Se estudió por primera vez en seres humanos para el tratamiento de cestodos intestinales (Rossignol y Maisonneuve, 1984) y ahora está autorizado en los Estados Unidos (Alinia®, Laboratorios Romark) para el
15 tratamiento de la diarrea causada por los parásitos protozoicos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*. NTZ también se ha comercializado ampliamente en América Latina y en India, donde está indicado para tratar un amplio espectro de infecciones parasitarias intestinales (Hemphill, Mueller *et al.*, 2006). El mecanismo de acción propuesto por el cual NTZ ejerce su actividad
20 antiparasitaria es a través de la inhibición de reacciones de transferencia de electrones dependientes de enzimas piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) que son esenciales para el metabolismo anaerobio. (Hoffman, Sisson *et al.*, 2007). NTZ también presentó actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, que no posee un homólogo de PFOR, lo que sugiere de este
25 modo un mecanismo de acción alternativo. De hecho, los autores han mostrado

que la NTZ también puede actuar como un desacoplador que altera el potencial de membrana y la homeostasis del pH dentro del organismo (de Carvalho, Darby *et al.*, 2011).

Los efectos farmacológicos de la NTZ no están restringidos a sus actividades antiparasitarias o antibacterianas y, en los últimos años, varios estudios han revelado que NTZ también puede conferir actividad antivírica (Di Santo y Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). La NTZ interfiere con la replicación vírica de diversas maneras, incluyendo un bloqueo en la maduración de las proteínas hemaglutinina (gripe) o VP7 (rotavirus), o la activación de la proteína PKR implicada en la respuesta inmunitaria innata (para una revisión, véase (Rossignol, 2014)). También se ha mostrado que la NTZ tiene amplias propiedades antineoplásicas al interferir con rutas de señalización metabólicas y promotoras de muerte (Di Santo y Ehrisman, 2014).

Los PPAR (α , β/δ (en lo sucesivo en el presente documento δ) y γ), pertenecen a la familia de los receptores nucleares activados por hormonas. Los PPAR, o "Receptores activados por proliferadores de peroxisomas", son receptores nucleares de la superfamilia de factores de transcripción activados por los siguientes ligandos: esteroides/hormonas tiroideas/retinoides. Hasta la fecha, se han identificado tres isotipos de PPAR en ratones y seres humanos: PPAR α , PPAR δ y PPAR γ . Mientras que la expresión de PPAR β/δ en seres humanos parece ser ubicua, PPAR α y γ presentan una distribución tisular diferencial (Braissant O y Wahli W, 1998). PPAR α se expresa en células con alta actividad catabólica de ácidos grasos y en células con alta actividad peroxisómica (hepatocitos, cardiomiocitos, túbulos proximales renales, mucosa intestinal). PPAR β/δ se expresa de forma ubicua y abundante en la mayoría de

los tejidos. En lo que se refiere a la expresión de PPAR γ , esta está limitada principalmente al tejido adiposo, determinadas células del sistema inmunitario y la retina y está presente solo en cantidades mínimas en otros órganos (Braissant O y Wahli W, 1998).

5 Tomando el ejemplo de PPAR α , su acción está mediada por una clase de compuestos tales como los fibratos que tienen un efecto hipolipemiante. También se han identificado ligandos naturales tales como, por ejemplo, ácidos grasos, eicosanoides (leucotrieno B₄) y ácido 8(S)-hidroxiicosatetraenoico (Kliewer SA *et al.*, 1997). Los PPAR se han asociado principalmente con el

10 metabolismo de los lípidos y la glucosa. Los activadores de CFTR, tales como fibratos, permiten una regulación de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma mediante la activación de PPAR α (Hourton D *et al.*, 2001). La terapia de fibrato conduce a un aumento en la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Los fibratos también disminuyen la síntesis de triglicéridos

15 (Staels B y Auwerx J, 1998). Los activadores de PPAR α también son capaces de corregir la hiperglucemia y el nivel de insulina. Los fibratos también reducen la masa del tejido adiposo a través de un mecanismo que es independiente del consumo de alimentos y la expresión del gen de la leptina (Guerre-Millo M *et al.*, 2000). El interés terapéutico de los agonistas de PPAR γ se ha investigado

20 ampliamente en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 (Spiegelman BM, 1998). Se ha mostrado que los agonistas de PPAR γ restauran la sensibilidad a la insulina en tejidos diana y reducen los niveles de glucosa, lípidos e insulina en plasma tanto en modelos animales de diabetes de tipo 2 como en seres humanos (Ram VJ, 2003). La activación de PPAR por ligandos también

25 desempeña un papel en la regulación de la expresión de genes que participan

en procesos tales como inflamación, angiogénesis, proliferación y diferenciación celular, apoptosis y las actividades de iNOS, MMPasa y TIMP. La activación de PPAR α en queratinocitos da como resultado el cese de su proliferación y expresión de genes implicados en la diferenciación (Komuves LG *et al.*, 2000). Los PPAR tienen propiedades antiinflamatorias porque interfieren negativamente con mecanismos de transcripción que implican otros factores de transcripción como NF- κ B o activadores de la transcripción como STAT y AP-1 (Desvergne B y Wahli W, 1999). Dichas propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas hacen que los PPAR (y en particular los PPAR α) sean dianas terapéuticas interesantes para el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades oclusivas vasculares (aterosclerosis, etc.), hipertensión, enfermedades relacionadas con la neovascularización (retinopatía diabética, etc.), enfermedades inflamatorias (enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, etc.) y enfermedades neoplásicas (carcinogénesis, etc.)

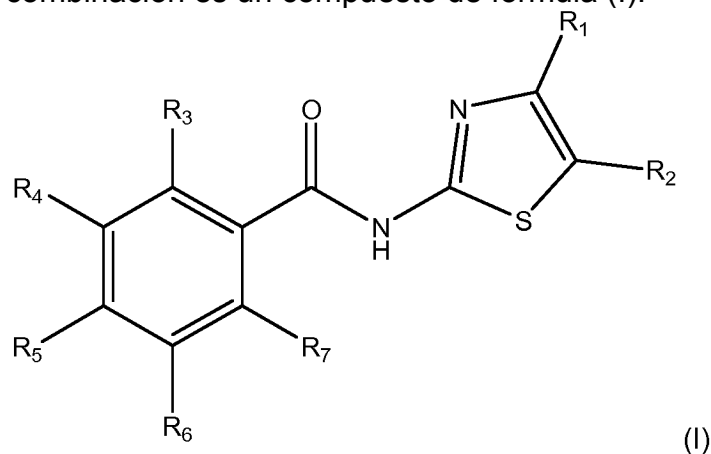
La presente invención describe nuevas combinaciones de análogos de NTZ y agonistas de PPAR y su uso en terapia, en particular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, metabólicas, fibróticas y colestásicas.

Los inventores descubrieron que NTZ, un agente antiprotozoico sintético o sus derivados o sus metabolitos en combinación con agonistas de PPAR muestran actividades terapéuticas que son útiles en terapia, en particular para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, inflamatorias, metabólicas, fibróticas o colestásicas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un producto de combinación que comprende:

- (i) un compuesto seleccionado de NTZ y un análogo de la misma; y
- (ii) al menos un agonista de PPAR.

En una realización particular, el compuesto del componente (i) del producto de combinación es un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R1 representa un átomo de hidrógeno (H), un átomo de deuterio (D), un átomo de halógeno, un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo alquilo (C1-C6), un grupo sulfonilo, un grupo sulfóxido, un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un alquiloxi (C1-C6), un grupo carboxílico, un grupo carboxilato, un grupo nitro (NO₂), un grupo amino (NH₂), un grupo alquilamino (C1-C6), un grupo amido, un grupo alquilamido (C1-C6), un grupo dialquilamido (C1-C6).

R2 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un grupo NO₂, un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un átomo de halógeno, un grupo alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo alquinilo (C2-C6), un grupo alquiloxi (C1-C6), un grupo alquiltio (C1-C6), un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un grupo alquilcarbonilamino (C1-C6), un grupo arilcarbonilamino (C6-C14), un grupo carboxílico o carboxilato, un grupo amido,

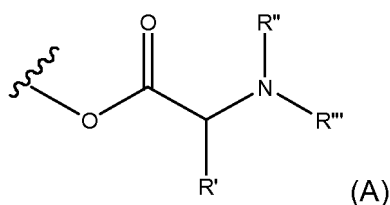
un grupo alquilamido (C1-C6), un grupo dialquilamido (C1-C6), un grupo NH₂, un grupo alquilamino (C1-C6),

o R1 y R2, junto con los átomos de carbono al que están unidos, forman un cicloalquilo de 5 a 8 miembros sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico

5 o arilo,

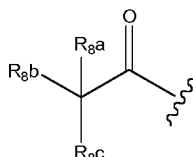
R3, R4, R5, R6 y R7, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un grupo alquilo (C1-C6), un grupo alquiloxi (C1-C6), un grupo alquiltio (C1-C6), un grupo alquilcarboniloxi (C1-C6), un grupo
10 ariloxi (C6-C14), un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo NO₂, un grupo sulfonilaminoalquilo, un grupo NH₂, un grupo aminoalquilo (C1-C6), un grupo alquilcarbonilamino (C1-C6), un grupo carboxílico, un grupo carboxilato o un grupo R9;

R9 representa un grupo O-R8 o un aminoácido seleccionado del grupo
15 que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina o un resto de fórmula (A):



20 en donde R' representa un grupo alquilo (C1-C6), un grupo alquenilo (C2-C6), un grupo alquinilo (C2-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14), grupo cicloalquilalquilo (C3-C14), un grupo cicloalquilo (C3-C14) alquenilo (C2-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquilo (C1-

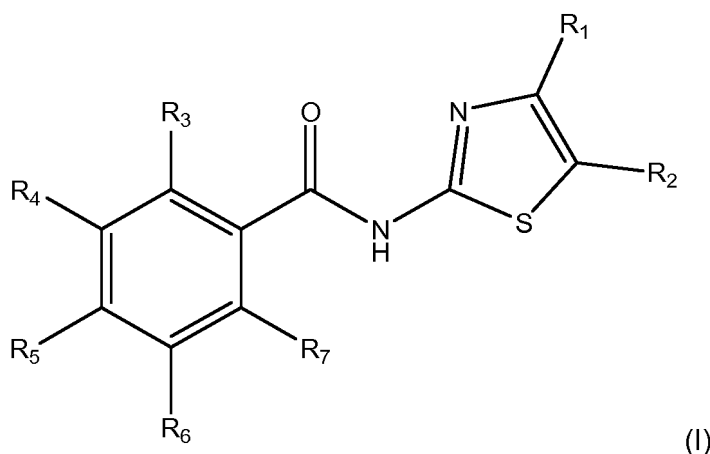
C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquenilo (C2-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquinilo (C2-C6); R'' y R''', independientemente, representan átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C1-C6) o un grupo protector de nitrógeno.



5

R8 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un grupo glucuronidilo o un grupo en donde, R8a, R8b y R8c, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un átomo de deuterio.

En una realización particular adicional, el compuesto del componente (i) del producto de combinación es un compuesto de fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R1 representa un átomo de hidrógeno (H), un átomo de deuterio (D), un átomo de halógeno, un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo alquilo (C1-C6), un grupo sulfonilo, un grupo sulfóxido, un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un alquilo (C1-C6), un grupo carboxílico, un grupo carboxilato, un grupo NO₂, un grupo NH₂, un grupo

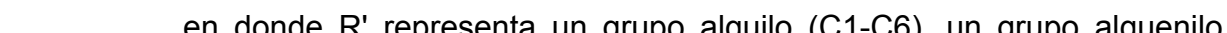
15

alquilamino (C1-C6), un grupo amido, un grupo alquilamido (C1-C6), un grupo dialquilamido (C1-C6).

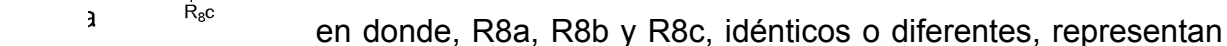
R2 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un grupo NO₂, un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un átomo de halógeno,
 5 un grupo alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo alquinilo (C2-C6), un grupo alquiloxi (C1-C6), un grupo alquiltio (C1-C6), un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un grupo alquilcarbonilamino (C1-C6), un grupo arilcarbonilamino (C6-C14), un grupo carboxílico o carboxilato, un grupo amido, un grupo alquilamido (C1-C6), un grupo dialquilamido (C1-C6), un grupo NH₂,
 10 un grupo alquilamino (C1-C6),

o R1 y R2, junto con los átomos de carbono al que están unidos, forman un cicloalquilo de 5 a 8 miembros sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico o arilo,

R3 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un átomo de halógeno, un grupo 0-R8, un grupo alquilcarbonilo (C1-C6), un grupo alquilo (C1-C6), un grupo alquiloxi (C1-C6), un grupo alquiltio (C1-C6), un grupo alquilcarboniloxi (C1-C6), un grupo ariloxi (C6-C14), un grupo arilo (C6-C14), un grupo heterocíclico, un grupo cicloalquilo (C3-C14), un NO₂, un grupo sulfonilaminoalquilo, un grupo NH₂, un grupo aminoalquilo (C1-C6), un grupo alquilcarbonilamino (C1-C6), un grupo carboxílico, un grupo carboxilato, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina o un resto de fórmula (A):



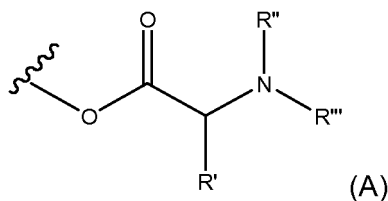
10 R8 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, o un grupo



R4, R5, R6 y R7, idénticos o diferentes, representan un átomo de

20 grupo carboxílico, un grupo carboxilato, un aminoácido seleccionado del grupo

que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina o un resto de fórmula (A):



5

en donde R' representa un grupo alquilo (C1-C6), un grupo alquenilo (C2-C6), un grupo alquinilo (C2-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo cicloalquilo (C3-C14) alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14) alquenilo (C1-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquenilo (C2-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquinilo (C2-C6); R'' y R''', independientemente, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C1-C6), o un grupo protector de nitrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular, en el compuesto de fórmula (I) de la presente invención: un grupo alquilo (C1-C6) puede ser un grupo alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido, en particular un grupo alquilo (C1-C4) sustituido o no sustituido;

un grupo alquinilo (C2-C6) puede ser un grupo alquinilo (C2-C6) sustituido o no sustituido; un grupo cicloalquilo (C3-C14) puede ser un grupo cicloalquilo (C3-C14) sustituido o no sustituido, un grupo alquilo (C1-C6) puede estar sustituido o no sustituido, tal como un grupo alquilo (C1-C4) sustituido o no sustituido;

un grupo alquilo (C1-C6) puede estar sustituido o no sustituido, tal

como un grupo alquiltio sustituido o no sustituido (C1-C4);

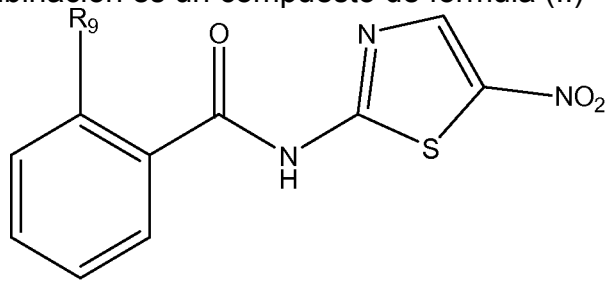
un grupo alquilamino (C1-C6) puede ser un grupo alquilamino (C1-C4);

un grupo dialquilamino (C1-C6) puede ser un grupo dialquilamino (C1-C4);

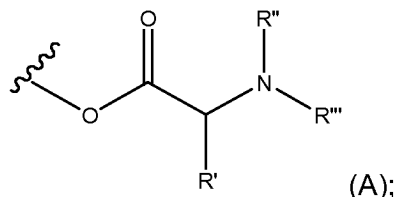
5 un grupo arilo (C6-C14) puede ser un grupo arilo (C6-C14) sustituido o no sustituido;

un grupo heterocíclico puede ser un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

En una realización particular, el compuesto del componente (i) del
10 producto de combinación es un compuesto de fórmula (II)



en el que R9 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, un grupo 0-R8 (R8 se ha definido anteriormente) o un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina,
15 metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina o un resto de fórmula (A):

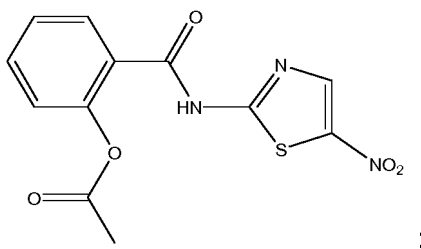


en donde R' representa un grupo alquilo (C1-C6), un grupo alquenilo

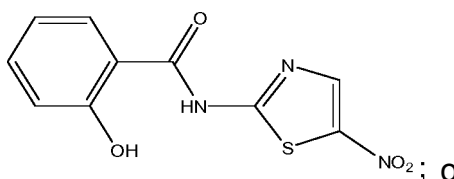
(C2-C6), un grupo alquinilo (C2-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14), un grupo cicloalquilo (C3-C14) alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquilo (C3-C14) alquenilo (C1-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquilo (C1-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquenilo (C2-C6), un grupo cicloalquenilo (C3-C14) alquinilo (C2-C6); R" y R"', independientemente, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C1-C6) o un grupo protector de nitrógeno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular, el componente (i) del producto de combinación de la invención se selecciona de:

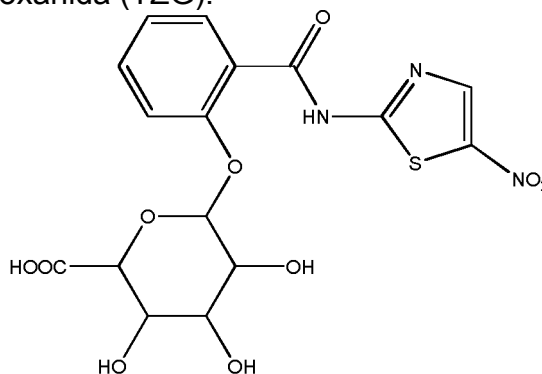
10 - NTZ:



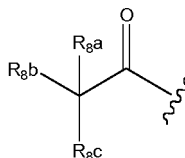
- tizoxanida:



- glucurónido de tizoxanida (TZG):



En otra realización, el componente (i) del producto de combinación es un compuesto de fórmula (I) o (II) en donde R8 representa un átomo de hidrógeno,

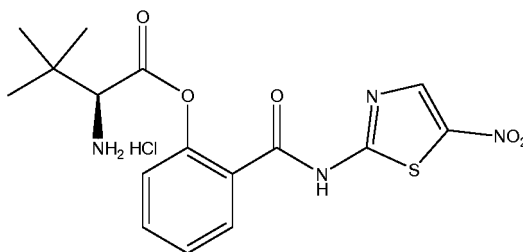


un átomo de deuterio o un grupo en donde, R8a, R8b y R8c, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un átomo de deuterio; y/o

en donde R1, R3, R4, R5 y R6, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un átomo de deuterio con la condición de que R1, R2, R2a, R2b, R2c, R3, R4, R5 y R6 no sean simultáneamente un átomo de hidrógeno.

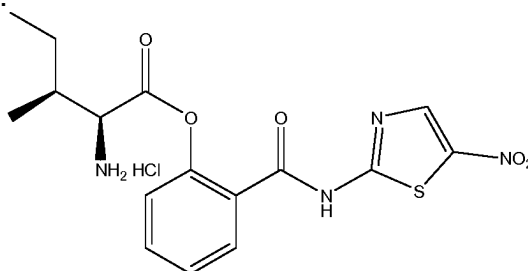
En una realización particular, el componente (i) es [(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d3)etanoato, [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d2)etanoato; o [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d1)etanoato.

En otra realización particular, el componente (i) es (clorhidrato de (S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato) (RM5061) o fórmula:



En otra realización particular, el componente (i) es (clorhidrato de (2S,3S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato)

(RM5066) de fórmula:



En una realización particular adicional, el agonista de PPAR es un agonista de PPAR-alfa, un agonista de PPAR-gamma, un agonista de PPAR-delta, un agonista doble de PPAR-alfa/gamma, un agonista doble de PPAR-
 5 alfa/delta, un agonista doble de PPAR-gamma/delta o panagonista de PPAR alfa/gamma/delta.

Según la invención, el(los) agonista(s) de PPAR y el componente (i) comprendidos en la combinación de la invención pueden seleccionarse de
 10 manera que la combinación de dicho(s) agonista(s) de PPAR y el componente (i) de la combinación de la invención proporcione una acción sinérgica contra enfermedades inflamatorias, metabólicas, fibróticas y colestásicas. Dicha sinergia se puede determinar según métodos bien conocidos en la técnica, tal como mediante el uso del método de exceso sobre Bliss (EOB) descrito en los
 15 ejemplos.

En una realización particular, el componente (ii) del producto combinado es:

- al menos un agonista de PPAR-alfa;
- al menos un agonista de PPAR-gamma;
- 20 - al menos un agonista de PPAR-delta;
- al menos un agonista doble de PPAR-alfa/delta;
- al menos un agonista de PPAR-alfa y al menos un agonista de PPAR-delta;

- al menos un agonista doble de PPAR-alfa/gamma;
- al menos un agonista de PPAR-alfa y al menos un agonista de PPAR-gamma;
- al menos un agonista doble de PPAR-gamma/delta;
- 5 - al menos un agonista de PPAR-gamma y al menos un agonista de PPAR-delta;
- al menos un panagonista de PPAR-alfa/gamma/delta; y
- al menos un agonista de PPAR-alfa, al menos un agonista de PPAR-gamma y al menos un agonista de PPAR-delta.

10 Según la presente invención, la expresión "agonistas(s) de PPAR" se refiere a los agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, que son una clase de fármacos que desempeña un papel central en la homeostasis de los lípidos y la glucosa. PPAR α influye principalmente en el metabolismo de los ácidos grasos y su activación reduce los niveles de lípidos,

15 mientras que PPAR γ está principalmente implicado en la regulación de la adipogénesis, el equilibrio energético y la biosíntesis de lípidos. PPAR δ participa en la oxidación de ácidos grasos, principalmente en músculos esqueléticos y cardíacos, pero también regula los niveles de glucosa y colesterol en sangre.

20 Según la invención, la expresión "agonista de PPAR alfa" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, fenofibrato, ciprofibrato, pema-fibrato, gemfibrozilo, clofibrato, binifibrato, clinofibrato, ácido clofíbrico, nicofibrato, pirifibrato, plafibrada, ronifibrato, teofibrato, tocofibrato y SR10171.

25 Según la invención, la expresión "agonista de PPAR gamma" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, rosiglitazona,

pioglitazona, pioglitazona deuterada, efatutazona, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001 y ALL-4.

Según la invención, la expresión "agonista de PPAR delta" como se usa
 5 en el presente documento incluye, pero sin limitación, GW501516 (endurabol o ácido $\{4-[(4\text{-metil-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-5-il}]\text{metil})\text{sulfanil}-2\text{-metilfenoxi}\}\text{acético})$), MBX8025 (seladelpar o ácido $\{2\text{-metil-4-[5-metil-2-(4-trifluorometil-fenil)-2H-[1,2,3]triazol-4-ilmetilsilfanil]-fenoxi}\}\text{-acético})$, GW0742 (ácido $[4-[[[2\text{-[3-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-4-metil-5-tiazolil}]\text{metil}]\text{tio}]\text{-2-metilfenoxi}]\text{acético})$, L165041, HPP-593 y NCP-1046.
 10

Según la invención, la expresión "agonista de PPAR alfa/gamma" (también denominado glitazar) usada en el presente documento incluye, pero sin limitación, saroglitazar, aleglitazar, muraglitazar, tesaglitazar y DSP-8658.

Según la invención, la expresión "agonista de PPAR alfa/delta" usada en
 15 el presente documento incluye, pero sin limitación, elafibranor (GFT505) o T913659.

Según la invención, la expresión "agonista de PPAR gamma/delta" usada en el presente documento incluye, pero sin limitación, un ácido linoleico conjugado (CLA), T3D-959.

20 Según la invención, la expresión "agonista de PPAR alfa/gamma/delta" usada en el presente documento incluye, pero sin limitación, IVA337 (lanifibranor), TTA (ácido tetradeciltioacético), bavaquinina, GW4148, GW9135, bezafibrato, lobeglitazona y CS038. En una realización adicional, el agonista de PPAR alfa/gamma/delta es ácido $2\text{-(4-(5,6-metilendioxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-metilfenoxi)-2-metilpropanoico}$ (MHY2013).
 25

El agonista de PPAR puede estar en forma de sal, hidrato, solvato, polimorfo o un cocrystal. El agonista de PPAR también puede estar en forma de hidrato, solvato, polimorfo o un cocrystal de una sal.

En una realización más particular, el agonista de PPAR es un compuesto
5 de fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

en el que:

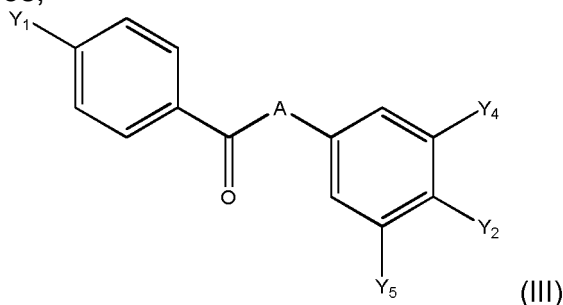
Y1 representa un halógeno, un Ra o grupo Ga-Ra;

A representa un grupo CH=CH o CH₂-CH₂;

Y2 representa un grupo Gb-Rb;

10 Ga y Gb, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o azufre;

Ra representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C1-C6) no sustituido, un grupo arilo (C6-C14) o un grupo alquilo (C1-C6) que está sustituido con uno o más átomos de halógeno, un alcoxi (C1-C6) o un grupo
15 alquiltio (C1-C6), grupos cicloalquilo (C3-C14), grupos cicloalquiltio (C3-C14) o grupos heterocíclicos;



Rb representa un grupo alquilo (C1-C6) sustituido con al menos un grupo -COORc, en donde Rc representa un átomo de hidrógeno o un grupo
20 alquilo (C1-C6) que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, Grupos cicloalquilo (C3-C14) o grupos heterocíclicos; e Y4 e Y5, idénticos o

diferentes, que representan un grupo alquilo (C1-C6) que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno, grupos cicloalquilo (C3-C14) o grupos heterocíclicos.

En una realización particular del compuesto de fórmula (III):

5 Y1 representa un halógeno, un Ra o un grupo Ga-Ra;

A representa un grupo CH=CH;

Y2 representa un grupo Gb-Rb;

Ga y Gb, idénticos o diferentes, representan un átomo de oxígeno o azufre;

10 Ra representa un grupo alquilo (C1-C6) o cicloalquilo (C3-C14), en particular un grupo alquilo (C1-C7) o cicloalquilo (C3-C14) sustituido o no con uno o más átomos de halógeno;

Rb representa un grupo alquilo (C1-C6) sustituido con un grupo -COOR₃, en donde Rc representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo

15 que tiene de uno a cuatro átomos de carbono; e

Y4 e Y5 representan independientemente un grupo alquilo (C1-C4).

En una realización particular del compuesto de fórmula (III):

Y1 representa un grupo Ra o Ga-Ra;

A representa un grupo CH₂-CH₂;

20 Y2 representa un grupo Gb-Rb;

Ga representa un átomo de oxígeno o azufre y Gb representa un átomo de oxígeno;

Ra representa un grupo alquilo (C1-C6) o cicloalquilo (C3-C7);

Rb representa un grupo alquilo (C1-C6) sustituido con al menos un
25 grupo -COOR_c, en donde Rc representa un átomo de hidrógeno o grupo alquilo

(C1-C4); e

Y4 e Y5 representan independientemente un grupo alquilo (C1-C4).

En una realización particular del compuesto de fórmula (III):

Y1 representa un átomo de halógeno o un grupo Ra o Ga-Ra;

5 A representa un grupo CH₂-CH₂;

Y2 representa un grupo Gb-Rb;

Ga representa un átomo de oxígeno o azufre y Gb representa un átomo de oxígeno;

10 Ra representa un grupo alquilo (C1-C6) o cicloalquilo (C3-C14) que está sustituido con uno o más átomos de halógeno;

Rb representa un grupo alquilo (C1-C6) sustituido o no con uno o más átomos de halógeno y sustituido con al menos un grupo -COORc, en donde Rc representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4); e

Y4 e Y5 representan un grupo alquilo (C1-C4).

15 En una realización particular del compuesto de fórmula (III), Gb es un átomo de oxígeno y Rb es un grupo alquilo (C1-C6) sustituido con un grupo -COORc, en donde Rc representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C1-C4) lineal o ramificado no sustituido.

20 En una realización particular del compuesto de fórmula (III), Y1 es un grupo alquiltio (C1-C6) que comprende un grupo alquilo (C1-C6) que es lineal o ramificado que está sustituido o no con uno o más átomos de halógeno.

25 En una realización particular, el compuesto de fórmula (III) se selecciona del grupo que consiste en 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona (elafibranor o GFT505), 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-isopropiloxicarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-

ona, 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-tercbutiloxicarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-tercbutiloxicarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometilfenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-tercbutiloxicarbonildimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, 1-[4-trifluorometiloxifenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetilmetiloxifenil]prop-2-en-1-ona, ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metilpropanoico y éster isopropílico de ácido 2-[2,6-dimetil-4-[3-[4-(metiltio)fenil]-3-oxo-propil]fenoxi]-2-metil-propanoico.

En una realización más particular, el agonista de PPAR es 1-[4-metiltiofenil]-3-[3,5-dimetil-4-carboxidimetiloxi-fenil]prop-2-en-1-ona(o elafibranor - GFT505), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular del producto de combinación de la invención:

- el componente (ii) se selecciona del grupo que consiste en elafibranor, saroglitazar, seladelpar y lanifibranor, siendo el componente (ii) más particularmente elafibranor;
- el componente (i) se selecciona de NTZ, TZ, [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d3)etanoato, [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d2)etanoato, [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil(d1)etanoato, (clorhidrato de (S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato) o (clorhidrato de (2S,3S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato).

En una realización adicional, el componente (i) se selecciona de TZG, 2-

(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato (tal como (S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato o su sal de clorhidrato), 2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato (tal como (2S,3S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato o su sal de clorhidrato), 2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato (tal como (S)-2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato o su sal de clorhidrato) y 2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato (tal como (2S,3S)-2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato o su sal de clorhidrato). En una variante adicional de esta realización, el componente (ii) se selecciona del grupo que consiste en elafibranor, saroglitazar, seladelpar y lanifibranor, siendo el componente (ii) más particularmente elafibranor; y el componente (i) se selecciona de TZG, 2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato (tal como (S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato o su sal de clorhidrato), 2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato (tal como (2S,3S)-2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato o su sal de clorhidrato), 2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato (tal como (S)-2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3,3-dimetilbutanoato o su sal de clorhidrato) y 2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato (tal como (2S,3S)-2-(5-clorotiazol-2-ilcarbamoil)fenil 2-amino-3-metilpentanoato o su sal de clorhidrato)

En una realización particular, el producto de combinación de la invención comprende además al menos otro agente terapéuticamente activo tal como un agente antifibrótico, un agente antiinflamatorio o un agente inmunosupresor.

Los agentes antifibróticos ilustrativos incluyen pirfenidona o inhibidores

de la tirosina quinasa receptora (RTKI) tales como nintedanib, sorafenib y otros RTKI, o bloqueadores del receptor de angiotensina II (AT1), o inhibidor de CTGF, o cualquier compuesto antifibrótico susceptible de interferir con las rutas activadas por TGF β y BMP, incluyendo activadores del complejo latente de TGF β tales como MMP2, MMP9, THBS1 o integrinas de la superficie celular, receptores de TGF β de tipo I (TGFBRI) o tipo II (TGFBRII) y sus ligandos tales como TGF β , activina, inhibina, Nodal, hormona antimulleriana, GDF o BMP, correceptores auxiliares (también conocidos como receptores de tipo III) o componentes de la ruta canónica dependiente de SMAD que incluyen proteínas SMAD reguladoras o inhibidoras o miembros de las rutas no canónicas o independientes de SMAD que incluyen diversas ramas de señalización de MAPK, TAK1, rutas de señalización de GTPasa de tipo Rho, rutas de fosfatidilinositol-3 quinasa/AKT, proceso de EMT inducido por TGF β o rutas de señalización de Hedgehog canónicas y no canónicas, que incluyen ligandos Hh o genes diana, o cualquier miembro de las rutas de WNT o Notch que son susceptibles de influir en TGF β .

Los agentes antiinflamatorios y/o inmunosupresores ilustrativos incluyen glucocorticoides, AINE, ciclofosfamida, nitrosoureas, análogos de ácido fólico, análogos de purina, análogos de pirimidina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, ciclosporina, miriocina, tacrolimus, sirolimus, derivados del ácido micofenólico, fingolimod y otros moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato, anticuerpos monoclonales y/o policlonales contra dianas tales como citocinas proinflamatorias y receptores de citocinas proinflamatorias, receptor de linfocitos T e integrinas.

En una realización particular, el producto de combinación de la invención

es una composición que comprende los componentes (i) y (ii) como se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización particular, el producto de combinación es un kit de partes que comprende los componentes (i) y (ii) como se ha descrito
5 anteriormente, para uso secuencial, separado o simultáneo.

En una realización adicional, los componentes i) y ii) están formulados en una suspensión inyectable, un gel, un aceite, una píldora, un comprimido, un supositorio, un polvo, una cápsula, un aerosol, una pomada, una crema, un parche o medio de formas galénicas para una liberación prolongada y/o lenta.

10 En otra realización, los componentes (i) y (ii) del producto combinado en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente.

La presente invención también se refiere al producto de combinación según la invención, para su uso como un medicamento.

La invención también se refiere a la combinación del producto descrito
15 en el presente documento, para su uso en un método para el tratamiento de la enfermedad. En otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del producto de combinación desvelado en el presente documento. En otra realización, se proporciona el uso
20 de un producto de combinación según la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

En particular, el producto de combinación de la presente invención es útil para el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades inmunitarias, inflamatorias, metabólicas, fibróticas y colestásicas. En una realización
25 particular, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hepatopatías

metabólicas, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA), hepatopatías inducidas por drogas, hepatopatías inducidas por alcohol, hepatopatías inducidas por agentes infecciosos, hepatopatías inflamatorias, hepatopatías mediadas por disfunción del sistema inmunitario,

5 dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, reestenosis, síndrome X, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, hipertensión, colangiopatías crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (CEP), colangitis biliar primaria (CBP), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar de tipo 3 (CIFP3), enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis

10 ulcerosa, queloide, infarto de miocardio viejo, esclerodermia/esclerosis sistémica, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas, cánceres, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, meningioma asociado con neurofibromatosis, tumores neuroendocrinos pancreáticos, tumores pancreáticos exocrinos, leucemia,

15 enfermedades mieloproliferativas/mielodisplásicas, mastocitosis, dermatofibrosarcoma, tumores sólidos incluyendo cáncer de mama, pulmón, tiroides o colorrectal, un cáncer de próstata, fibrosis hepática o cirrosis de cualquier origen, fibrosis hepática inducida por enfermedad metabólica o cirrosis, fibrosis o cirrosis inducida por EHNA, fibrosis o cirrosis inducida por

20 ENA, fibrosis o cirrosis hepática inducida por alcohol, fibrosis o cirrosis hepática inducida por drogas, fibrosis o cirrosis hepática inducida por agentes infecciosos, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección parasitaria, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección bacteriana, fibrosis o cirrosis inducida por infección vírica, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección

25 por VHB, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHC, fibrosis o

cirrosis hepática inducida por infección por VIH, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección doble por VHC y VIH, fibrosis o cirrosis inducida por radiación o quimioterapia, fibrosis de las vías biliares, fibrosis o cirrosis hepática debida a cualquier enfermedad colestásica crónica, fibrosis intestinal
5 de cualquier etiología, fibrosis inducida por enfermedad de Crohn, fibrosis inducida por colitis ulcerosa, fibrosis intestinal (por ejemplo, del intestino delgado), fibrosis colónica, fibrosis estomacal, fibrosis cutánea, fibrosis epidérmica, fibrosis endodérmica, fibrosis cutánea debida a esclerodermia/esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar
10 consecutiva a enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador, tuberculosis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), fibrosis cardíaca, fibrosis renal, fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis muscular, fibrosis de tejidos blandos (por ejemplo mediastino o retroperitoneo), fibrosis de la médula ósea, fibrosis
15 articular, fibrosis tendinosa, fibrosis condral, fibrosis pancreática, fibrosis uterina, fibrosis del sistema nervioso, fibrosis testicular, fibrosis ovárica, fibrosis de la glándula suprarrenal, fibrosis arterial, fibrosis venosa, fibrosis ocular, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva (una complicación de la antracosis
20 pulmonar), fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis periimplantacional y asbestosis, artrofibrosis, capsulitis adhesiva.

En una realización más preferida, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hepatopatías metabólicas, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA), hepatopatías inducidas por
25 drogas, hepatopatías inducidas por alcohol, hepatopatías inducidas por

agentes infecciosos, hepatopatías inflamatorias, hepatopatías mediadas por disfunción del sistema inmunitario, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, reestenosis, síndrome X, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, hipertensión, colangiopatías crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (CEP), colangitis biliar primaria (CBP), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar de tipo 3 (CIFP3), enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, fibrosis hepática inducida por enfermedad metabólica o cirrosis, fibrosis o cirrosis inducida por EHNA, fibrosis o cirrosis inducida por ENA, fibrosis o cirrosis hepática inducida por alcohol, fibrosis o cirrosis hepática inducida por drogas, fibrosis o cirrosis hepática inducida por agentes infecciosos, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección parasitaria, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección bacteriana, fibrosis o cirrosis inducida por infección vírica, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHB, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHC, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VIH, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección doble por VHC y VIH, fibrosis o cirrosis inducida por radiación o quimioterapia, fibrosis de las vías biliares, fibrosis o cirrosis hepática debida a cualquier enfermedad colestásica crónica, fibrosis intestinal de cualquier etiología, fibrosis inducida por enfermedad de Crohn, fibrosis inducida por colitis ulcerosa, fibrosis intestinal (por ejemplo, del intestino delgado), fibrosis colónica, fibrosis estomacal, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador,

tuberculosis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (FPI),

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la combinación de la invención, para su uso en la inhibición de la proliferación y/o activación de fibroblastos responsables de la producción de fibras de colágeno y/o
5 responsables de la producción de la matriz extracelular.

Según la presente invención, la expresión "enfermedades autoinmunitarias" se usa para designar una afección que surge de una respuesta inmunitaria anómala del cuerpo contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. La enfermedad puede estar
10 restringida a determinados órganos (por ejemplo, en la diabetes de tipo I o tiroiditis autoinmunitaria) o implicar un tejido particular en diferentes lugares (por ejemplo, en la enfermedad de Goodpasture, afección de la membrana basal en el pulmón y el riñón).

El término "inflamación" se usa para designar una afección que surge de
15 una respuesta protectora que implica a las células hospedadoras, vasos sanguíneos y proteínas y otros mediadores que pueden servir para eliminar la causa de lesión celular/tisular, así como las células/tejidos necróticos resultantes de la lesión original, y para iniciar el proceso de reparación. La reacción inflamatoria puede manifestarse por dolor, calor, enrojecimiento,
20 hinchazón, dilatación de los vasos sanguíneos, aumento del flujo sanguíneo y pérdida de función.

Las expresiones "fibrosis", "enfermedad fibrótica", "trastorno fibrótico" y sus declinaciones indican una afección patológica de deposición excesiva de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido. De manera más específica, la
25 fibrosis es un proceso patológico, que incluye una formación de cicatriz fibrótica

persistente y sobreproducción de matriz extracelular, por el tejido conjuntivo, como respuesta al daño tisular. Fisiológicamente, el depósito de tejido conjuntivo puede destruir la arquitectura y la función del órgano o tejido subyacente.

5 Según la presente invención, la fibrosis o el trastorno fibrótico pueden estar asociados con cualquier fibrosis de órganos o tejidos. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes, de fibrosis de órganos particulares incluyen fibrosis hepática, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, tendinosa, condral, cardíaca, pancreática, pulmonar, uterina, del sistema nervioso,
10 testicular, peneana, ovárica, de la glándula suprarrenal, arterial, venosa, colónica, intestinal (por ejemplo, del intestino delgado), de las vías biliares, del tejido blando (por ejemplo mediastino o retroperitoneo), de la médula ósea, de las articulaciones (por ejemplo rodilla, hombro u otras articulaciones) o estomacal.

15 En una realización particular, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, renal, cutánea, epidérmica, endodérmica, muscular, tendinosa, condral, cardíaca, pancreática, pulmonar, uterina, del sistema nervioso, testicular, ovárica, de la glándula suprarrenal, arterial, venosa, colónica, intestinal (por ejemplo, del intestino delgado), de las
20 vías biliares, del tejido blando (por ejemplo mediastino o retroperitoneo), de la médula ósea, de las articulaciones (por ejemplo rodilla, hombro u otras articulaciones), ocular o estomacal.

 En una realización preferida, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en una fibrosis hepática, del intestino, pulmonar, cardíaca,
25 renal, muscular, cutánea, del tejido blando (por ejemplo mediastino o

retroperitoneo), de la médula ósea, intestinal y de las articulaciones (por ejemplo rodilla, hombro u otras articulaciones).

En una realización más preferida, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en la fibrosis hepática, pulmonar, intestinal, cardíaca,
5 cutánea, renal e intestinal.

En otra realización, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, pulmonar, cardíaca e intestinal. En una realización más particular, el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, pulmonar, cutánea, renal e intestinal. En otra
10 realización, el trastorno fibrótico es fibrosis hepática.

En una realización más preferida de la presente invención, el trastorno fibrótico tratado se selecciona del grupo que consiste en la siguiente lista no exhaustiva de trastornos fibróticos: esteatohepatitis no alcohólica (ENA), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cutánea, fibrosis ocular
15 (tal como fibrosis capsular), fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva (una complicación de la antracosis pulmonar), fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias (EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador,
20 tuberculosis, FPI), fibrosis hepática inducida por alcohol o drogas, cirrosis hepática, fibrosis hepática inducida por infección, fibrosis inducida por radiación o quimioterapia, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, queloide, infarto de miocardio viejo, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, algunas formas de capsulitis adhesiva, colangiopatías
25 crónicas fibrosas tales como colangitis esclerosante primaria (CEP) y colangitis

biliar primaria (CBP), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar de tipo 3 (CIFP3), fibrosis periimplantacional y asbestosis.

La colestasis se define como una disminución en el flujo biliar debido a la secreción alterada por hepatocitos (colestasis hepatocelular) o a la obstrucción del flujo biliar a través de vías biliares intra o extrahepáticas (colestasis obstructiva). En la práctica clínica, la colestasis es cualquier afección en la que el flujo de bilis desde el hígado se ralentiza o se bloquea. Según una realización particular de la invención, la enfermedad colestestásica se selecciona del grupo que consiste en colangitis biliar primaria (CBP), colangitis esclerosante primaria (CEP), colestasis intrahepática del embarazo, colestasis intrahepática familiar progresiva, atresia biliar, colelitiasis, colangitis infecciosa, colangitis asociada con histiocitosis de células de Langerhans, síndrome de Alagille, escasez ductal no sindrómica, colestasis inducida por drogas y colestasis asociada a nutrición parenteral total. En una realización preferida, la enfermedad colestásica es CBP o CEP, en particular CBP.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias, enfermedades fibróticas, enfermedades metabólicas y enfermedades colestásicas incluyen hepatopatías metabólicas, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA), hepatopatías inducidas por drogas, hepatopatías inducidas por alcohol, hepatopatías inducidas por agentes infecciosos, hepatopatías inflamatorias, hepatopatías mediadas por disfunción del sistema inmunitario, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, reestenosis, síndrome X, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, hipertensión, colangiopatías crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (CEP), colangitis biliar primaria (CBP), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar de tipo 3 (CIFP3),

enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis
ulcerosa, queloide, infarto de miocardio viejo, esclerodermia/esclerosi
sistémica, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas,
cánceres, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, cáncer gastrointestinal,
5 cáncer gástrico, meningioma asociado con neurofibromatosis, tumores
neuroendocrinos pancreáticos, tumores pancreáticos exocrinos, leucemia,
enfermedades mieloproliferativas/mielodisplásicas, mastocitosis,
dermatofibrosarcoma, tumores sólidos incluyendo cáncer de mama, pulmón,
tiroides o colorrectal, un cáncer de próstata, fibrosis hepática o cirrosis de
10 cualquier origen, fibrosis hepática inducida por enfermedad metabólica o
cirrosis, fibrosis o cirrosis inducida por EHNA, fibrosis o cirrosis inducida por
ENA, fibrosis o cirrosis hepática inducida por alcohol, fibrosis o cirrosis hepática
inducida por drogas, fibrosis o cirrosis hepática inducida por agentes
infecciosos, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección parasitaria,
15 fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección bacteriana, fibrosis o cirrosis
inducida por infección vírica, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección
por VHB, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHC, fibrosis o
cirrosis hepática inducida por infección por VIH, fibrosis o cirrosis hepática
inducida por infección doble por VHC y VIH, fibrosis o cirrosis inducida por
20 radiación o quimioterapia, fibrosis de las vías biliares, fibrosis o cirrosis
hepática debida a cualquier enfermedad colestásica crónica, fibrosis intestinal
de cualquier etiología, fibrosis inducida por enfermedad de Crohn, fibrosis
inducida por colitis ulcerosa, fibrosis intestinal (por ejemplo, del intestino
delgado), fibrosis colónica, fibrosis estomacal, fibrosis cutánea, fibrosis
25 epidérmica, fibrosis endodérmica, fibrosis cutánea debida a

esclerodermia/esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador, tuberculosis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), fibrosis cardíaca, fibrosis renal, 5 fibrosis sistémica nefrogénica, fibrosis muscular, fibrosis de tejidos blandos (por ejemplo mediastino o retroperitoneo), fibrosis de la médula ósea, fibrosis articular, fibrosis tendinosa, fibrosis condral, fibrosis pancreática, fibrosis uterina, fibrosis del sistema nervioso, fibrosis testicular, fibrosis ovárica, fibrosis de la glándula suprarrenal, fibrosis arterial, fibrosis venosa, fibrosis ocular, 10 fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva (una complicación de la antracosis pulmonar), fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis periimplantacional y asbestosis, artrofibrosis, capsulitis adhesiva.

Preferentemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en 15 hepatopatías metabólicas, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), esteatohepatitis no alcohólica (ENA), hepatopatías inducidas por drogas, hepatopatías inducidas por alcohol, hepatopatías inducidas por agentes infecciosos, hepatopatías inflamatorias, hepatopatías mediadas por disfunción del sistema inmunitario, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, 20 reestenosis, síndrome X, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, hipertensión, colangiopatías crónicas tales como colangitis esclerosante primaria (CEP), colangitis biliar primaria (CBP), atresia biliar, colestasis intrahepática familiar de tipo 3 (CIFP3), enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cáncer de hígado, carcinoma 25 hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer colorrectal,

fibrosis hepática inducida por enfermedad metabólica o cirrosis, fibrosis o cirrosis inducida por EHNA, fibrosis o cirrosis inducida por ENA, fibrosis o cirrosis hepática inducida por alcohol, fibrosis o cirrosis hepática inducida por drogas, fibrosis o cirrosis hepática inducida por agentes infecciosos, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección parasitaria, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección bacteriana, fibrosis o cirrosis inducida por infección vírica, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHB, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VHC, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección por VIH, fibrosis o cirrosis hepática inducida por infección doble por VHC y VIH, fibrosis o cirrosis inducida por radiación o quimioterapia, fibrosis de las vías biliares, fibrosis o cirrosis hepática debida a cualquier enfermedad colestásica crónica, fibrosis intestinal de cualquier etiología, fibrosis inducida por enfermedad de Crohn, fibrosis inducida por colitis ulcerosa, fibrosis intestinal (por ejemplo, del intestino delgado), fibrosis colónica, fibrosis estomacal, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar consecutiva a enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como EPOC, asma, enfisema, pulmón de fumador, tuberculosis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

El término "tratamiento" o "tratar" se refiere a la curación o prevención de un trastorno fibrótico en un sujeto que lo necesite. El tratamiento implica la administración de la combinación de la invención a un sujeto que tiene un trastorno declarado, es decir, a un paciente, para prevenir, curar, retrasar, invertir o frenar la progresión del trastorno, mejorando de este modo la condición del sujeto. También se puede administrar un tratamiento a un sujeto que está sano o en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico.

Por lo tanto, según la invención, el tratamiento de una enfermedad inmunitaria, inflamatoria, metabólica, fibrótica y colestásica implica la administración de la combinación de la presente invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica que contiene los componentes (i) y (ii)
5 de la combinación, a un sujeto que tiene un trastorno declarado para curar, retrasar, invertir o frenar la progresión del trastorno, mejorando de este modo la condición del paciente o a un sujeto sano, en particular un sujeto que está en riesgo de desarrollar dicha enfermedad.

El tratamiento implica la administración de la combinación de la
10 invención a un paciente que tiene un trastorno declarado para curar, retrasar o ralentizar el progreso, mejorando de este modo la condición del paciente o a un sujeto sano, en particular un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, metabólica, fibrótica y colestásica.

El sujeto para tratar es un mamífero, preferentemente un ser humano. El
15 sujeto para tratar según la invención puede seleccionarse basándose en varios criterios asociados a enfermedades fibróticas tales como tratamientos farmacológicos anteriores, patologías asociadas, genotipo, exposición a factores de riesgo, infección vírica, así como basándose en la detección de cualquier biomarcador relevante que pueda evaluarse mediante métodos de
20 captura de imágenes y métodos inmunológicos, bioquímicos, enzimáticos, químicos o de detección de ácidos nucleicos.

Los sujetos para tratar según la invención pueden seleccionarse basándose en varios criterios asociados a enfermedades inflamatorias, metabólicas, fibróticas y colestásicas, tales como tratamientos farmacológicos
25 anteriores, patologías asociadas, genotipo, exposición a factores de riesgo,

infección vírica, así como cualquier otro biomarcador relevante que pueda evaluarse por medio de métodos de captura de imágenes y métodos inmunológicos, bioquímicos, enzimáticos, químicos o de detección de ácidos nucleicos.

- 5 La síntesis de NTZ o análogos puede llevarse a cabo, por ejemplo, como se describe en (Rossignol y Cavier, 1975), o por cualquier otra forma de síntesis conocida por un experto en la materia.

 En una realización particular, el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, metabólica, fibrótica y colestásica puede comprender la
10 administración de una composición que comprende al menos dos compuestos seleccionados de NTZ y análogos de NTZ. En esta realización, el al menos un agonista de PPAR administrado se proporciona en la misma composición que los dos compuestos o en una forma separada, tal como en una composición diferente.

- 15 En otra realización, la combinación de la invención es para administración simultánea, secuencial o separada en terapia, incluyéndose por lo tanto posiblemente en diferentes composiciones. En caso de administración secuencial, pueden administrarse NTZ y/o análogo(s) de NTZ antes que el(los) agonista(s) de PPAR o el(los) agonista(s) de PPAR se administra(n) antes de
20 NTZ y/o análogo(s) de NTZ.

 Pueden formularse NTZ y análogo(s) de NTZ como sales farmacéuticamente aceptables, particularmente sales de ácidos o bases compatibles con el uso farmacéutico. Las sales de NTZ y análogo(s) de NTZ incluyen sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales de
25 adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales metálicas

farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y amonio alquilado. Estas sales se pueden obtener durante la etapa de purificación final del compuesto o incorporando la sal en el compuesto previamente purificado.

La combinación de un compuesto de Fórmula (I) o (II) con uno o más
5 agonista(s) de PPAR se puede formular como sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables obtenidas de bases o ácidos orgánicos o inorgánicos del compuesto de Fórmula (I) o (II) o agonista(s) de PPAR. Estas sales se pueden obtener durante la etapa de purificación final del compuesto o incorporando la sal en el compuesto previamente purificado.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden un compuesto de Fórmula (I) o (II) y uno o más agonistas de PPAR también pueden comprender uno o varios excipientes o vehículos, aceptables dentro de un contexto farmacéutico (por ejemplo, soluciones salinas, soluciones fisiológicas, soluciones isotónicas, etc., compatibles con el
15 uso farmacéutico y bien conocidos por un experto habitual en la materia).

Estas composiciones también pueden comprender uno o varios agentes o vehículos elegidos entre dispersantes, solubilizantes, estabilizadores, conservantes, etc. Los agentes o vehículos útiles para estas formulaciones (líquidas y/o inyectables y/o sólidos) son particularmente metilcelulosa,
20 hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, goma arábiga, liposomas, etc.

Estas composiciones pueden formularse en forma de suspensiones inyectables, geles, aceites, pomadas, píldoras, supositorios, polvos, cápsulas de gelatina, cápsulas, aerosoles, etc., con el tiempo por medio de formas
25 galénicas o dispositivos que aseguren una liberación prolongada y/o lenta. Para

este tipo de formulación, se pueden usar provechosamente agentes tales como celulosa, carbonatos o almidones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden un compuesto de Fórmula (I) o (II) y uno o más agonistas de PPAR pueden administrarse por diferentes vías y en diferentes formas. Por ejemplo, el(los) compuesto(s) pueden administrarse por vía sistémica, por vía oral, por vía parenteral, por inhalación, por pulverización nasal, por instilación nasal o por inyección, tal como, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía transdérmica, por vía tópica, por vía intraarterial, etc.

Por supuesto, la vía de administración se adaptará a la forma de NTZ y/o análogo(s) de NTZ en combinación con uno o más agonistas de PPAR según procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

Se administran NTZ y/o análogo(s) de NTZ en combinación con uno o más agonistas de PPAR en una cantidad terapéuticamente eficaz. Dentro del contexto de la invención, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto suficiente para producir el resultado terapéutico deseado.

La frecuencia y/o dosis en relación con la administración puede ser adaptada por un experto en la materia, en función del paciente, la patología, la forma de administración, etc. Normalmente, la combinación (tal como en forma de una composición farmacéutica o un kit de partes) de la presente invención puede administrarse para el tratamiento de una enfermedad fibrótica en una dosis para NTZ, o un análogo de NTZ o un agonista de PPAR, tal como un compuesto de Fórmula (I) o (II) o (III), comprendido entre 0,01 mg/día y 4000

mg/día, tal como de 50 mg/día a 2000 mg/día y particularmente de 100 mg/día a 1000 mg/día.

La dosis del(los) agonista(s) de PPAR en dicha combinación puede variar según el agonista de PPAR en sí mismo. La dosis se adapta a la eficacia
5 del agonista de PPAR.

En una realización preferida de la invención, NTZ se usa en combinación con elafibranor a una dosis comprendida entre 100 mg/día y 1000 mg/día (tal como 1000 mg/día) (en particular de 20 mg/día a 40 mg/día) para NTZ y de 80 a 120 mg/día para elafibranor.

10 En otra realización preferida, los principios activos se administran como una o más composiciones farmacéuticas en forma de píldora destinada a una ingestión oral. Se puede realizar administración diariamente o incluso varias veces al día, si es necesario.

La invención se describe adicionalmente en referencia a los siguientes
15 ejemplos, no limitantes.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Efecto antifibrótico de elafibranor y nitazoxanida en hHSC inducida por TGFβ

Se preincubaron HSC privadas de suero durante 1 hora con elafibranor
20 (A) o nitazoxanida (B) o bezafibrato (C) antes de la activación con la citocina profibrogénica TGFβ1 (1 ng/ml). Después de 48 horas de incubación, la expresión de α-SMA se midió mediante ELISA. Los valores obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición sobre el control de TGFβ1. Los datos se presentan como media (triplicados) ± desviación típica (DT)]. El ajuste de la
25 curva y el cálculo de la mitad de la concentración inhibidora máxima (CI₅₀) se

realizaron con el software XLFit 5.3.1.3.

Figura 2: La combinación de elafibranor con nitazoxanida inhibe de forma sinérgica α -SMA en hHSC inducidas por TGF β 1

Las combinaciones se ensayaron en un formato de matriz de respuesta a dosis y se analizaron según el modelo de aditivismo de exceso sobre Bliss (EOB). Se prepararon series de dilución de elafibranor (fila) y nitazoxanida (columna), incluyendo sus controles de DMSO respectivos. Las mezclas resultantes se añadieron a HSC privadas de suero, 1 hora antes de la activación con la citocina profibrogénica TGF β 1 (1 ng/ml). (A) Porcentaje de inhibición de α -SMA sobre el control de TGF β 1 para todos los pares de combinación. Los datos se presentan como la media de cuadruplicados. (B) Se calcularon las puntuaciones de EOB como se describe en Materiales y métodos. Cualquier par de compuestos con valor de EOB positivo se consideró sinérgico (coloreado de gris claro a negro). También se calculó la puntuación total de EOB incluyendo todas las combinaciones. (C) Los valores de los datos procedentes de un par de combinación sinérgica se representaron en una representación de gráfica de barras. Los datos se presentan como media (cuadruplicados) $\pm$ desviación típica (DT). El modelo de EOHSA se usó como se describe en la sección de Materiales y métodos para confirmar la sinergia de los pares de combinación NTZ/ELA seleccionados.

Figura 3: La combinación de agonistas de PPAR con nitazoxanida inhibe de forma sinérgica α -SMA en hHSC inducidas por TGF β 1

Las combinaciones se ensayaron en un formato de matriz de respuesta a dosis y se analizaron según el modelo de aditivismo de exceso sobre Bliss (EOB). Se prepararon series de diluciones de saroglitazar, seladelpar y

lanifibranor, y nitazoxanida, incluyendo sus controles de DMSO respectivos. Las mezclas resultantes se añadieron a HSC privadas de suero, 1 hora antes de la activación con la citocina profibrogénica TGF β 1 (1 ng/ml). Se calculó el porcentaje de inhibición de α -SMA sobre el control de TGF β 1 para todos los pares de combinación. Se calcularon las puntuaciones de EOB como se describe en Materiales y métodos. Cualquier par de compuestos con valor de EOB positivo se consideró sinérgico (coloreado de gris claro a negro).

(A) sarogliazar (SARO)

(B) seladelpar (SELA)

10 (C) lanifibranor (LANI)

El porcentaje de inhibición de α -SMA sobre el control de TGF β 1 procedente de un par de combinación sinérgica se representó en una representación de gráfico de barras. Los datos se presentan como media (cuadruplicados) $\pm$ desviación típica (DT). El modelo de EOHSa se usó como se describe en la sección de Materiales y métodos para confirmar la sinergia de los pares de combinación.

Figura 4: Contenido de colágeno hepático

Se alimentaron ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad con una dieta de control (CSAA), dieta de CDAA + CHOL 1 % (CDAAc) o dieta de CDAAc complementada con NTZ (30 mg/kg/día o 100 mg/kg/día durante 12 semanas) o elafibranor (1 mg/kg/día o 3 mg/kg/día) o una combinación de elafibranor y NTZ (respectivamente 1+30 mg/kg/día, 1+100 mg/kg/día, 3+30 mg/kg/día y 3+100 mg/kg/día). Para cada gráfico se indicó la cantidad exacta de dosis de exposición.

25 Después del sacrificio, se determinó el contenido de colágeno hepático.

Figura 5: Porcentaje de fibrosis hepática

Se alimentaron ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad con una dieta de control (CSAA), dieta de CDAA + CHOL 1 % (CDAAc) o dieta de CDAAc complementada con NTZ (30 mg/kg/día o 100 mg/kg/día durante 12 semanas) o Elafibranor (1 mg/kg/día o 3 mg/kg/día) o una combinación de Elafibranor y NTZ (respectivamente 1+30 mg/kg/día, 1+100 mg/kg/día, 3+30 mg/kg/día y 3+100 mg/kg/día). Para cada gráfico se indicó la cantidad exacta de dosis de exposición.

Después del sacrificio, se determinó el área de fibrosis hepática.

10 Figura 6: Expresión hepática del gen de α SMA

Figura 7: Expresión hepática del gen de CCR2

Figura 8: Expresión hepática del gen de CCR5

Figura 9: Expresión hepática del gen de Col1a2

Figura 10: Expresión hepática del gen de MMP2

15 Figura 11: Expresión hepática del gen de TIMP2

Figura 12: Expresión hepática del gen de TGF β 1

Abreviaturas usadas en las figuras, en las tablas y en el texto:

AP-1	proteína activadora 1
ASBTi	inhibidor del transportador de ácido biliar codependiente de sodio apical
ASK1	quinasa reguladora de señal 1
AT1	angiotensina 1
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CTGF	factor de crecimiento del tejido conjuntivo
DGAT	diacilglicerol-O-aciltransferasa

DMSO	dimetilsulfóxido
ADN	ácido desoxirribonucleico
DPP4	dipeptidil peptidasa
ELISA	inmunoensayo ligado a enzimas
EOB	exceso sobre Bliss
FABAC	conjugado de ácido graso y ácido biliar
FBS	suero bovino fetal
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FXR	Receptor farnesoide X
GDF	factor de diferenciación del crecimiento
GLP-1	péptido de tipo glucagón-1
GPCR	receptor acoplado a proteína G
VHB	virus de la hepatitis B
VHC	virus de la hepatitis C
15-HEPE	ácido 5-hidroxeicosapentaenoico
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
HSC	célula estrellada hepática
CI50	concentración inhibitoria semimáxima
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
FPI	fibrosis pulmonar idiopática
LANI	lanifibranor
LBD	dominio de unión a ligando
LPS	lipopolisacárido
LT	leucotrieno
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno

MMP-9	metaloproteasa 9
MMPasa	metaloproteasa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
EHNA	esteatosis hepática no alcohólica
ENA	esteatohepatitis no alcohólica
NF-κB	factor nuclear kappa B
NOX	NADPH oxidasa
AINE	fármacos antiinflamatorios no esteroideos
NTZ	nitazoxanida
PAR	receptor activado por proteasa
CBP	colangitis biliar primaria
PDE	fosfodiesterasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
CIFP3	colestasis intrahepática familiar de tipo 3
PFOR	piruvato:ferredoxina oxidorreductasa
PPAR	receptor activado por proliferador de peroxisoma
PPRE	elementos de respuesta a PPAR
CEP	colangitis esclerosante primaria
ROCK	proteína quinasa asociada a Rho
RTK	tirosina quinasa receptora
SARO	saroglitazar
DT	desviación típica
SELA	seladelpar
SGLT	transporte de sodio-glucosa
STAT	transductores de señal y activadores de la

	transcripción
TGF β	factor de crecimiento transformante β
TGFBRI	receptores de TGF β de tipo I
TGFBRII	receptores de TGF β de tipo II
THBS1	trombospondina 1
THR β	receptor tiroideo β
TIMP	inhibidor tisular de la metaloproteasa
TLR-4	receptor 4 de tipo Toll
TZ	tizoxanida
TZG	glucurónido de tizoxanida
VAP-1	proteína de adhesión vascular 1

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Fluka cat n.º 41640). Nitazoxanida (INTERCHIM cat n.º RQ550U), tizoxanida (INTERCHIM cat n.º RP253), lanifibranor (ARK PHARM cat n.º AK689102), seladelpar (ARK PHARM cat n.º AK689146) y saroglitazar (CHEMEXPRESS cat n.º YY-1997A) se obtuvieron comercialmente.

Cultivo de hHSC

Las células estrelladas hepáticas primarias humanas (hHSC) (Innoprot) se cultivaron en medio STeCM (ScienCell cat n.º 5301) que se complementó con suero bovino fetal al 2 % (FBS, ScienCell cat n.º 0010), penicilina/estreptomicina al 1 % (ScienCell cat n.º 0503) y complemento de crecimiento de células estrelladas (SteCGS; ScienCell cat n.º 5352). Los matraces de cultivo celular se recubrieron con poli-L lisina (Sigma cat. n.º

P4707) para una mejor adherencia.

Preparación de composiciones

Matriz de combinación de 2 componentes (NTZ/elafibranor)

Para estos experimentos, se generó una matriz ajedrezada. Se diluyeron
5 reservas de TNZ y elafibranor en serie en DMSO en series de 5 puntos en una
fila (agonista de PPAR elafibranor) y una serie de 6 puntos en una columna de
NTZ) de una placa de 96 pocillos o una placa de 384 pocillos. Posteriormente,
la matriz de combinación 5X6 se generó mediante la mezcla 1:1 de todas las
concentraciones de agente único. Las concentraciones de ensayo para cada
10 compuesto se eligieron en función de la Cl_{50} respectiva de cada compuesto
como agente único obtenido al medir el contenido de α -SMA en el modelo de
HSC estimulado con TGF- β 1.

Después, se seleccionaron concentraciones 2 y 4 veces más altas y más
bajas.

Activación de hHSC con tratamiento de TGF- β 1 y compuesto

Las células estrelladas hepáticas primarias humanas (hHSC) (Innoprot)
se cultivaron en condiciones convencionales, como se ha descrito
anteriormente. Las células se sembraron posteriormente a una densidad de $2 \times$
 10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos y 6500 células/pocillo en placas de
20 384 pocillos para la medida de α -SMA por ELISA. Al día siguiente, el medio de
cultivo celular se eliminó y las células se lavaron con solución salina
tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen cat nº 14190). Las hHSC se privaron
durante 24 horas en medio sin suero y medio sin SteCGS.

Para los tratamientos con NTZ, elafibranor u otros agonistas de PPAR y
25 las respectivas combinaciones de NTZ/elafibranor o agonistas de PPAR, las

hHSC privadas de suero se preincubaron durante 1 hora con los compuestos seguidos de la adición de los estímulos profibrogénicos TGF- β 1 (PeproTech cat n.º 100-21, 1 ng/ml) en medio sin suero y sin SteCGS durante un periodo de 48 horas adicionales.

5 **ELISA de α -SMA**

El nivel de α -SMA se midió usando un ELISA de tipo sándwich. En resumen, los pocillos de una placa ELISA se recubrieron en primer lugar con el anticuerpo de captura (anti-ACTA2 monoclonal de ratón, Abnova) a 4 °C durante una noche. Después de 3 lavados en PBS + Tween 20 0,2 %, se
10 añadió una solución de bloqueo que consistía en PBS + BSA al 0,2 % durante una hora, seguido de otro ciclo de lavado. Los lisados celulares se transfirieron a los pocillos para unirse al anticuerpo de captura durante un periodo de 2 horas a temperatura ambiente. Después del procedimiento de lavado, el anticuerpo de detección (anti-ACTA2 monoclonal de ratón biotinilado, Abnova)
15 se añadió durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de 3 lavados. Para la detección, se aplicó en primer lugar una estreptavidina conjugada con HRP (R&D Systems, cat n.º DY998) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió el sustrato de HRP TMB (BD, n.º 555214) y se incubó durante 7 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Tras la oxidación,
20 TMB forma un producto de reacción azul hidrosoluble que se vuelve amarillo con la adición de ácido sulfúrico (solución de parada), permitiendo una medición precisa de la intensidad a 450 nm usando un espectrofotómetro. El color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de α -SMA presente en el lisado.

25 **Determinación de la sinergia mediante el método de exceso sobre Bliss**

(EOB) y confirmación mediante EOSHSA (exceso sobre el mayor agente individual)

Los valores obtenidos en los ensayos ELISA de α SMA se transformaron en primer lugar en porcentajes de inhibiciones sobre el control de TGF- β 1.

5 Después, usando estos porcentajes de inhibiciones, se determinó el EOB (exceso sobre Bliss) para definir los efectos sinérgicos de las combinaciones de fármacos. La puntuación esperada de aditivismo de Bliss (E) se determinó en primer lugar mediante la ecuación:

$E = (A + B) - (A \times B)$ donde A y B son el porcentaje de inhibición de NTZ
10 (A) y elafibranor, saroglitazar, seladelpar o lanifibranor (B) a una dosis dada. La diferencia entre la expectativa de Bliss y la inhibición observada de la combinación de NTZ/elafibranor, saroglitazar, seladelpar o lanifibranor a la misma dosis es la puntuación de "exceso sobre Bliss".

- La puntuación de exceso sobre Bliss = 0 indica que el tratamiento de
15 combinación es aditivo (como se espera para los efectos de rutas independientes);
- La puntuación de exceso sobre Bliss >0 indica actividad mayor que la aditiva (sinergia); y
- La puntuación de exceso sobre Bliss <0 indica que la combinación es menos
20 aditiva (antagonismo). Para la combinación NTZ + elafibranor, se calculó una puntuación total de Bliss adicional mediante la suma de todas las EOB.

La EOHSA es una medida convencional de la sinergia utilizada por la FDA para la evaluación de combinaciones de fármacos y se calcula como la
25 diferencia del efecto producido por la combinación de fármacos y el mayor efecto producido por cada uno de los agentes individuales de la combinación a

las mismas concentraciones que cuando se combinan (Borisy *et al.*, 2003). Para combinaciones sinérgicas identificadas por el método de EOB, e 1% de inhibición experimental se representó en un gráfico de barras y la significación de las diferencias observadas entre NTZ/ELA y agente individual se estimó mediante ANOVA de una vía y LSD de Fisher sin corregir *post hoc* (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Evaluación de elafibranor, nitazoxanida y la combinación elafibranor + nitazoxanida en un modelo crónico de CDAA + colesterol al 1 % si hay ENA fibrosa (12 semanas)

10 **Diseño experimental**

La dieta deficiente en colina y definida por L-aminoácidos (CDAA) carece de colina, que es esencial para la β -oxidación hepática y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad, y se cree que induce a los hepatocitos a almacenar grasa y posteriormente causar daño celular. El modelo de roedores inducido por la dieta CDAA desarrolla fibrosis en un periodo de tiempo relativamente corto, ideal para estudiar rápidamente la reversibilidad de la patología de ENA, particularmente fibrosis.

El aumento del consumo de colesterol acelera la fibrosis hepática en varios modelos de ratón de ENA. El agravamiento de la fibrosis hepática implica principalmente la acumulación de colesterol libre en las células estrelladas hepáticas, que sensibiliza las células al factor de crecimiento transformante β (TGF β) y posteriormente agrava la fibrosis hepática.

En el estudio actual, los inventores han examinado los efectos de la nitazoxanida en la fibrosis hepática en ratones C57Bl/6J alimentados con una dieta CDAA complementada con colesterol al 1 %.

Los efectos preventivos de elafibranor solo, NTZ solo y la combinación de ambos se evaluaron en un modelo de ENA fibrosa de ratones alimentados con una dieta CDAA + colesterol al 1 %. Se alimentaron ratones macho C57Bl/6 de 6 semanas de edad con una dieta de control (CSAA), dieta CDAA +
 5 colesterol al 1 % o dieta CDAA + colesterol al 1 % complementada con elafibranor 1 y 3 mg/kg/día, NTZ 30 y 100 mg/kg/día o fármacos combinados (elafibranor 1 y 3 mg/kg/día combinado con NTZ 30 y 100 mg/kg/día) durante 12 semanas.

El peso corporal y la ingesta de alimentos se supervisaron dos veces por
 10 semana. El último día de tratamiento, los ratones se sacrificaron después de un periodo de ayuno de 6 h. El hígado se escindió rápidamente para estudios bioquímicos e histológicos.

Todos los procedimientos con animales se realizaron según protocolos convencionales y de acuerdo con las recomendaciones convencionales para el
 15 cuidado y uso adecuado de los animales de laboratorio.

Se alimentaron ratones macho C57BL/6 de 6 semanas de edad durante 12 semanas según un plan experimental detallado en la tabla 1:

Dieta	Compuesto	Dosis mg/kg/día	Número de ratones
CSAA			8
			12
	Elafibranor	1	8
		3	8
CDAA + col 1 %	NTZ	30	8
		100	8

Dieta	Compuesto	Dosis mg/kg/día	Número de ratones
	Elafibranor + NTZ	1+30	8
		1+100	8
		3+30	8
		3+100	8

Tabla 1: Plan experimental

El control fue la dieta CSAA.

Algunos ratones fueron alimentados con la dieta CDAAc.

Algunos ratones fueron alimentados con dieta CDAAc complementada
5 con elafibranor a 1 o 3 mg/kg/día. Algunos ratones fueron alimentados con
dieta CDAAc complementada con NTZ a 30 o 100 mg/kg/día.

Algunos ratones fueron alimentados con la dieta CDAAc complementada
con una combinación de elafibranor + NTZ en diferentes proporciones: 1+30,
1+100, 3+30 y 3+100 mg/kg/día.

10 El grupo correspondiente a la dieta CDAAc complementada con NTZ a
30 mg/kg también se denomina ratones C57Bl/6J alimentados con dieta CDAA
+ nitazoxanida al 0,02 % (p/p) correspondiente a la dosis teórica de 30
mg/kg/día.

15 El grupo correspondiente a la dieta CDAAc complementada con NTZ a
100 mg/kg también se denomina ratones C57Bl/6J alimentados con dieta
CDAA + nitazoxanida al 0,0667 % (p/p) correspondiente a la dosis teórica de
100 mg/kg/día.

La comida se obtuvo de la compañía Ssniff® (Soest, Alemania).

Ssniff® incorporó nitazoxanida (consúltese referencia en la Tabla 1) en

la dieta CDAA + col al 1 % en forma de polvo a la dosis necesaria.

La referencia y el número de lote de nitazoxanida se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2: Referencias de nitazoxanida

5

Compuesto (INN)	Código de laboratorio		Proveedor	Referencia	Lote
	ID externa	ID de Genfit			
Nitazoxanida	GFE 50455	GSL022 597.08	Interchim	RQ550	1501

Para cada dosis, se realizó un cálculo de las dosis exactas según el siguiente ejemplo. Esto permite tener en cuenta la dosis exacta de cada producto que fue consumida exactamente por cada grupo de ratones.

10 Cálculo de las dosis reales de tratamiento: ejemplo con nitazoxanida 0,02 % (p/p)

- La ingesta de alimentos se expresa en gramos de alimento/gramos de animal/día
- 0,02 % de nitazoxanida en la dieta

15 o 0,02 g de cpd/100 g de alimento = 0,2 mg de cpd/g de alimento

- Dosis real de cpd:
 - o 0,2 mg de cpd/gramo de alimento/gramo de animal/día
 - o (0,2 mg de cpd/gramo de alimento/gramo de animal/día) X1000 = (0,2 mg de cpd/gramo de alimento/kg de animal/día) = 200 mg de

cpd/gramo de alimento/kg de animal por día

En consecuencia, multiplicando por 200 el valor del consumo de alimentos expresado en gramos de alimentos/gramos de animal/día; el valor obtenido corresponde a la dosis real administrada expresada en mg de NTZ/kg

5 de animal/día.

De la misma manera:

- Para la dosis de NTZ 0.00667 % p/p, la dosis de tratamiento real se obtuvo multiplicando el valor del consumo de alimentos (gramos de alimentos/gramos de animal/día) por 66,7.
- 10 • Para la dosis de NTZ 0.0667 % p/p, la dosis de tratamiento real se obtuvo multiplicando el valor del consumo de alimentos (gramos de alimentos/gramos de animal/día) por 667.

Según el cálculo, la dosis calculada frente a la dosis estimada se proporciona en las siguientes tablas 3 y 4.

Grupos	GFT505		NTZ	
Dosis estimadas	1 mp k	3 mpk	30 mpk	100 mp k
Dosis calculadas	1 mp k	2,8 mp k	26,3 m pk	78,1 mp k

15 Tabla 3: dosis estimadas y calculadas para cada compuesto a dosis diferentes

Grupos	Combo 1		Combo 2		Combo 3		Combo 4	
	GFT50 5	NTZ	GFT50 5	NTZ	GFT50 5	NTZ	GFT50 5	NTZ
Dosis estimadas	1 mpk	30 mpk	1 mpk	100 mpk	3 mpk	30 mpk	3 mpk	100 mpk
Dosis calculadas	0,9 mpk	26,4 mpk	0,9 mpk	79,4 mpk	2,9 mpk	27,4 mpk	2,8 mpk	77,7 mpk

Tabla 4: dosis estimadas y calculadas para cada combinación a dosis diferentes

El peso corporal y el consumo de alimentos se registraron dos veces por
5 semana durante todo el estudio.

Al final del periodo de tratamiento, los animales se anestesiaron con
isoflurano y se tomaron muestras de sangre como se describe posteriormente.
Los animales se sacrificaron después mediante dislocación cervical y se
decapitaron para escisión y pesado del cerebro. También se recogió y pesó el
10 hígado. Parte del hígado se fijó en formalina al 4 %, se incluyó en parafina y se
utilizó para análisis histológicos. El hígado restante se congeló
instantáneamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C hasta su uso para
análisis adicionales.

Se tomaron muestras de sangre en el momento del sacrificio después de
15 un periodo de ayuno de 6 horas. Las muestras de sangre se extrajeron con
anestesia mediante punción retroorbital. Se centrifugaron rápidamente tubos de

heparina que contenían sangre (15 minutos a 4.000 rpm/4 °C) y se recogió la fracción de plasma. Se almacenaron alícuotas de plasma a -20 °C hasta adicionales posteriores.

Bioquímica de plasma

5 **Alanina amino transferasa (ALT)**

La concentración plasmática de ALT se determinó usando el kit Randox adecuado para la automatización de Daytona (Randox, cat n.º AL 3801). En resumen, la ALT dentro de la muestra de plasma transforma enzimáticamente α -oxoglutarato y L-alanina en L-glutamato y piruvato. En presencia de NADH, el
 10 piruvato generado se convierte mediante lactato deshidrogenasa para formar L-lactato y NAD^+ . La cinética de la reacción se ha estudiado y permite calcular el nivel plasmático de ALT. Los resultados se expresan en U/l.

Aspartato amino transferasa (AST)

La concentración plasmática de AST se determinó usando el kit Randox
 15 adecuado para la automatización de Daytona (Randox, cat n.º AS 3804). En resumen, la AST dentro de la muestra de plasma transforma enzimáticamente α -oxoglutarato y L-aspartato en L-glutamato y oxaloacetato. En presencia de NADH, el oxaloacetato generado se convierte mediante malato deshidrogenasa para formar L-malato y NAD^+ . La cinética de la reacción se ha estudiado y
 20 permite calcular el nivel plasmático de AST. Los resultados se expresan en U/l.

Histología

En el momento del sacrificio, se procesaron muestras de hígado para análisis histológico y se examinaron de la siguiente manera.

Inclusión y seccionamiento de tejidos

25 Los cortes de hígado se fijaron en primer lugar durante 12 horas en una

solución de formalina al 4 %. Después, los trozos de hígado se lavaron 30 minutos en PBS y se deshidrataron en soluciones de etanol (baños sucesivos a 70, 80, 95 y 100 % de etanol). Los trozos de hígado se incubaron en tres baños diferentes de xileno (Sigma-Aldrich cat n° 534056), seguidos de dos baños en parafina líquida (60 °C). Después se colocaron trozos de hígado en rejillas que se llenaron suavemente con Histowax® hasta cubrir completamente el tejido.

Los bloques de parafina que contenían los trozos de tejido se retiraron de las rejillas y se almacenaron a temperatura ambiente. Los bloques de hígado se dividieron en cortes de 3 µm.

10 Tinción con picrosirius

Los cortes de hígado se desparafinizaron, se rehidrataron y se incubaron durante 15 minutos en una solución de Fast Green FCF a 0,04 % (Sigma-Aldrich, cat n° F7258) antes de aclarar en un baño de ácido acético al 0,5 % (Sigma-Aldrich, cat. n.º 695092). Después, los cortes de hígado se aclararon con agua y se incubaron durante 30 minutos en una solución de Fast Green FCF al 0,04 % - rojo sirio 0,1 % (Direct Red 80, Fluka cat n.º 43665) en ácido pícrico acuoso saturado (Sigma-Aldrich cat n.º P6744). Después los cortes se deshidrataron y se montaron utilizando el medio de montaje CV (Leica, cat n.º 14046430011).

20 Exámenes histológicos

Un técnico que desconocía la fuente de cada muestra de hígado realizó exámenes histológicos. Se generaron cortes virtuales utilizando el escáner Panoramic 250 de 3D Histech. Usando el software Quant Center (3D Histech, incluyendo los módulos Pattern Quant y Histo Quant), se cuantificaron las áreas teñidas con colágeno. En resumen, se usó Pattern Quant para detectar el

tejido y medir su superficie. Después, se usó Histo Quant para detectar el contenido de colágeno teñido y medir su superficie, basándose en un método de umbral de color. El área de fibrosis se expresó después como el porcentaje de la superficie de colágeno con respecto al tejido completo para cada animal.

- 5 La estadificación de la fibrosis hepática se evaluó con ocultación, utilizando criterios de fibrosis de la CRN.

Se proporcionan detalles sobre los parámetros, la cuantificación/recuento y el número de campos considerados en la siguiente tabla 5.

Parámetro	Puntos en la puntuación	Descripción (se consideró el corte completo)
Fibrosis	0	Sin fibrosis
	1	Fibrosis centrilobular perisinusoidal/pericelular o fibrosis portal/periportal
	2	Fibrosis centrilobular perisinusoidal/pericelular y fibrosis portal/periportal
	3	Fibrosis centrilobular perisinusoidal/pericelular y/o fibrosis portal con fibrosis en puentes focal o extensa
	4	Cirrosis

- 10 Tabla 5: Criterios de la CRN para la fibrosis

Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresaron como media $\pm$ desviación típica (DT) y se representaron como gráficos de barras o curvas. Se realizaron análisis estadísticos utilizando Prism Versión 7, de la siguiente manera:

- 5 Para las medidas realizadas después del sacrificio, se compararon los grupos CSAA frente a CDAA + col al 1 % mediante una prueba de la t de Student (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$) o mediante una prueba de Mann-Whitney (\$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$: $p < 0,001$). Los grupos de tratamiento se compararon con dieta CDAA + col. al 1 % mediante ANOVA de una vía y LSD
- 10 de Fisher sin corregir. *post hoc* (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Medición del contenido de colágeno hepático

- El contenido de colágeno hepático se determinó usando el kit QuickZyme adecuado (ensayo de colágeno total, de cat nº QZB-totcol5). El ensayo se basa en la detección de hidroxiprolina, que es un aminoácido no
- 15 proteinogénico que se encuentra principalmente en la triple hélice del colágeno. Por tanto, se puede usar hidroxiprolina en hidrolizados de tejidos como una medida directa de la cantidad de colágeno presente en el tejido (sin discriminación entre procolágeno, colágeno maduro y productos de degradación del colágeno).

- 20 Es necesaria la hidrólisis completa de muestras de tejido en HCl 6 M a 95 °C antes de administrar la hidroxiprolina. El ensayo da como resultado la generación de un cromógeno con una absorbancia máxima a 570 nm. Los resultados se expresan como mg de colágeno/g de hígado.

Propéptido N-terminal de procolágeno III (PIIINP)

- 25 La concentración plasmática de PIIINP se determinó usando un ensayo

ELISA de Cloud-Clone Corp (cat n° SEA573Ra), según las instrucciones del fabricante. La placa de microtitulación se recubre previamente con un anticuerpo específico para PIIINP. Se añaden patrones o muestras a los pocillos de la placa de microtitulación adecuados con un anticuerpo conjugado con biotina específico para PIIINP. A continuación, se agrega avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo de la microplaca y se incuba. Después de añadir solución de sustrato de TMB, solo los pocillos que contienen PIIINP, anticuerpo conjugado con biotina y avidina conjugada con enzimas presentarán un cambio en el color. La reacción enzima-sustrato se termina mediante la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm $\pm$ 10 nm. La concentración de PIIINP en las muestras se determina comparando la DO de las muestras con la curva patrón. Los resultados se expresan en pg/ml.

15 **Expresión génica**

Extracción de ARN

Se aisló el ARN total hepático usando el kit Nucleospin® 96 (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transcribieron de forma inversa 150 ng de ARN total en ADNc usando MMLV-RT (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney) (Invitrogen cat n.º 28025) en presencia de tampón RT 1x (Invitrogen cat n.º P/NY02321), DTT 1 mM (Invitrogen cat n.º P/NY00147), DNTP 0,5 mM (Promega), 200 ng de pdN6 (Roche cat n.º 11034731001) y 40 U de inhibidor de ribonucleasa (Promega cat n.º N2515).

25 Después se llevó a cabo PCR cuantitativa usando el sistema de

detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (Biorad). En resumen, se realizaron reacciones de PCR en placas de 96 pocillos en 5 µl de mezcla de transcripción inversa diluida 5x utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad cat n.º 170887). Las condiciones experimentales fueron: 20 µl de volumen de reacción y 0,5 µl de cada uno de los cebadores inverso y directo (10 pMol).

Nombre del cebador	ID de secuencia	Secuencia (5'→3')
αSMA directo	1	CTGACAGAGGCACCACTGAA
αSMA inverso	2	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
Col1α1 directo	3	AGGCGAACAAGGTGACAGAG
Col1α1 inverso	4	GCCAGGAGAACCAGCAGAG
Col1α2 directo	5	ATTGGAAGCCGAGGTCCCAG
Col1α2 inverso	6	TTTGCCCCCAGGTATGCCAG
TGFβ1 directo	7	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA
TGFβ1 inverso	8	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TIMP1 directo	9	ATTCAAGGCTGTGGGAAATG
TIMP1 inverso	10	CTCAGAGTACGCCAGGGAAC
TIMP2 directo	11	GCATCACCCAGAAGAAGAGC
TIMP2 inverso	12	GGGTCCTCGATGTCAAGAAA
MMP2 directo	13	TCCCTAAGCTCATCGCAGAC
MMP2 inverso	14	GCTTCCAAACTTCACGCTCT
MMP7 directo	15	TAATTGGCTTCGCAAGGAGA
MMP7 inverso	16	AAGGCATGACCTAGAGTGTTC

Nombre del cebador	ID de secuencia	Secuencia (5'→3')
CCR2 directo	17	TAATATGTTACCTCAGTTCATCCACGG
CCR2 inverso	18	TGCTCTTCAGCTTTTTACAGCCTATC
CCR5 directo	19	ATTCTCCACACCCTGTTTCG
CCR5 inverso	20	GAATTCCTGGAAGGTGGTCA
GAPDH directo	21	TATGACTCCACTCACGGCAA
GAPDH inverso	22	TCCACGACATACTCAGCACC

Los niveles de expresión se normalizaron usando la expresión del gen de GAPDH como referencia.

Para cada gen, la curva patrón se dibujó seleccionando los mejores puntos (al menos tres puntos) para tener una eficacia de reacción de PCR cercana al 100 % y un coeficiente de correlación cercano a 1. Los niveles de expresión se determinaron usando la ecuación de curva patrón tanto para el gen constitutivo como para el gen objetivo (teniendo en cuenta la eficacia de PCR específica de cada gen diana).

10 **Resultados y conclusiones:**

La persistencia anómala de miofibroblastos diferenciados es una característica de muchas enfermedades fibróticas.

Después de una lesión hepática, las HSC inactivas experimentan un proceso de activación que se caracteriza por una diferenciación en miofibroblastos (α -SMA) positivos.

Se mostró que NTZ como agente individual confiere una actividad antifibrótica en hHSC inducida por TGF β (Fig. 1B). Como se sabe que la NTZ

se hidroliza rápidamente en su metabolito activo tizoxanida (TZ) (Broekhuysen, Stockis *et al.* 2000), este metabolito también se evaluó para determinar su actividad antifibrótica en HSC. TZ mostró un perfil similar al del fármaco parental (datos no mostrados). Por otro lado, algunos agonistas de PPAR como elafibranor también revelaron un perfil antifibrótico en el modelo de HSC inducido por TGF β (Fig. 1A). Otros agonistas de PPAR como bezafibrato revelaron una actividad débil que sugiere que los agonistas de PPAR no son equivalentes con respecto a sus propiedades antifibróticas (Fig. 1C).

Para evaluar si una combinación de elafibranor con NTZ podría reducir la fibrosis de manera sinérgica, se realizaron experimentos de matriz de combinación en HSC inducidas por TGF β . En resumen, las soluciones de NTZ y elafibranor se diluyeron en serie en un formato ajedrezado, generando una matriz de 42 combinaciones que cubría un gran panel de relaciones de elafibranor/NTZ. La sinergia se determinó en primer lugar mediante el cálculo de las puntuaciones de exceso sobre Bliss. Estos experimentos revelaron que NTZ podría actuar de forma sinérgica con elafibranor para reducir la producción de α -SMA en HSC activadas. Varios pares de combinación revelaron una puntuación de EOB mayor de 10, lo que es indicativo de una sinergia (Fig. 2B).

Para validar la sinergia, los valores experimentales correspondientes a puntuación de EOB superior se representaron en un gráfico de barras (Fig. 2C). Estos gráficos ilustran que la combinación de NTZ con elafibranor muestra un efecto antifibrótico superior que es estadísticamente significativo en comparación con el agente individual más alto (NTZ o elafibranor). El ejemplo más impresionante se representa con el par de combinación NTZ a 0,6 μ M y elafibranor a 5 μ M. Aunque NTZ casi no muestra actividad antifibrótica a 0,6

μM , la adición de elafibranor a 5 μM da como resultado una fuerte reducción de αSMA del 55 %, que es mucho más fuerte que el efecto observado solamente con los agentes individuales. Con el fin de evaluar si una combinación de otros agonistas de PPAR, saroglitazar, seladelpar y lanifibranor con NTZ, podría

5 reducir la fibrosis de manera sinérgica, también se realizaron experimentos combinados de matriz de combinación en HSC inducidas por $\text{TGF}\beta$ y se determinó la puntuación de EOB. Para evaluar la sinergia con la combinación de NTZ con saroglitazar, seladelpar y lanifibranor se validaron en la actividad antifibrótica. La combinación de NTZ con saroglitazar, seladelpar o lanifibranor

10 reveló una puntuación de $\text{EOB} > 0$, que es indicativa de una sinergia. La combinación de saroglitazar a 2,5 μM y NTZ a 0,625 μM también da como resultado una fuerte reducción de αSMA del 52 %, que es mucho más fuerte que el efecto observado con los agentes individuales solos (Fig. 3A). La combinación de seladelpar a 20 μM y NTZ a 2,5 μM también da como resultado

15 una fuerte reducción de αSMA del 72 %, que es mucho más fuerte que el efecto observado solamente con los agentes individuales (Fig. 3B). En menor medida, la combinación de lanifibranor a 10 μM y NTZ a 1,25 μM tiende a ser significativa ($p=0,06$) para reducir la producción de $\alpha\text{-SMA}$ en HSC activadas en comparación con NTZ (Fig. 3C).

20 En conclusión, el solicitante ha descubierto actividades antifibróticas inesperadas para una combinación de un compuesto de Fórmula (I) con uno o más agonistas de PPAR específicos. Estos resultados sugieren que una combinación de un compuesto de Fórmula (I) con un agonista de PPAR puede ser sinérgica y puede proporcionar beneficios terapéuticos en múltiples tipos de

25 enfermedades fibróticas.

La administración de una dieta deficiente en colina y deficiente en L-aminoácidos (CDAA) + colesterol al 1 % a ratones provoca una esteatohepatitis fibrosa progresiva que es patológicamente similar a la esteatohepatitis no alcohólica humana (ENA).

- 5 La dieta de CDAA + colesterol al 1 % induce notablemente un aumento significativo en el colágeno hepático, como se muestra en la figura 4.

Esta figura también muestra que la administración de elafibranor o NTZ solo disminuye el contenido de colágeno hepático. La disminución de colágeno es proporcional a la dosis de elafibranor o NTZ administrada.

- 10 Cuando se administra una combinación de elafibranor y NTZ, la disminución de colágeno producido es mayor que la disminución observada para cada compuesto tomado por separado.

- Por lo tanto, existe un efecto sinérgico de la combinación de elafibranor y NTZ sobre la disminución de la producción de colágeno. En otras palabras, se
15 observa un efecto antifibrótico cuando se combinan elafibranor y NTZ.

El mejor efecto se observa para la combinación que comprende elafibranor a 2,8 mpk (mg por kilogramo) y NTZ a 77,7 mpk, expresado en dosis calculadas.

- La figura 5 representa los resultados obtenidos con la histología, es
20 decir, la determinación del área de fibrosis que se expresó como el porcentaje de la superficie de colágeno con respecto al tejido entero para cada animal.

La dieta de CDAA + colesterol al 1 % induce notablemente un aumento significativo en el porcentaje de fibrosis.

- La Figura 5 también muestra que la administración de elafibranor o NTZ
25 sola disminuye el porcentaje de fibrosis. La disminución es proporcional a la

dosis de elafibranor o NTZ administrada.

Cuando se administra una combinación de elafibranor y NTZ, la disminución del porcentaje de fibrosis es mayor que la disminución observada para cada compuesto tomado por separado.

- 5 Por lo tanto, existe un efecto sinérgico de la combinación de elafibranor y NTZ sobre la disminución del porcentaje de fibrosis. En otras palabras, se observa un efecto antifibrótico cuando se combinan elafibranor y NTZ.

- El mejor efecto se observa para la combinación que comprende elafibranor a 2,8 mpk (mg por kilogramo) y NTZ a 77,7 mpk, expresado en
10 dosis calculadas.

Las figuras 6 a 12 representan la expresión génica de diferentes marcadores hepáticos de fibrosis. Para todos los marcadores, la dieta de CDAA + colesterol al 1 % induce notablemente un aumento significativo de las expresiones génicas.

- 15 También se puede observar que la administración de elafibranor o NTZ sola disminuye el nivel de la expresión génica diferente. La disminución es proporcional a la dosis de elafibranor o NTZ administrada.

- Cuando se administra una combinación de elafibranor y NTZ, la disminución de la expresión génica es mayor que la disminución observada
20 para cada compuesto tomado por separado.

Por lo tanto, existe un efecto sinérgico de la combinación de elafibranor y NTZ sobre la disminución de la expresión génica de diferentes marcadores hepáticos de fibrosis. En otras palabras, se observa un efecto antifibrótico sinérgico cuando se combinan elafibranor y NTZ.

- 25 En conclusión, el solicitante ha descubierto actividades antifibróticas

sinérgicas inesperadas para una combinación de un compuesto de Fórmula (I) con uno o más agonistas de PPAR específicos. Estos resultados sugieren que una combinación de un compuesto de Fórmula (I) con un agonista de PPAR puede ser sinérgica y/o puede tener efectos adicionales y también puede proporcionar beneficios terapéuticos en múltiples tipos de enfermedades fibróticas.

REFERENCIAS

Broekhuysen, J., A. Stockis, *et al.* (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." Int J Clin Pharmacol Ther **38**(8): 387-394.

Borisy, A.A., Elliott, P.J., Hurst, N.W., Lee, M.S., Lehar, J., Price, E.R., Serbedzija, G., Zimmermann, G.R., Foley, M.A., Stockwell, B.R., Keith C.T. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24 jun 2003;100(13):7977-82.

de Carvalho, L. P. S., C. M. Darby, *et al.* (2011). "Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*." ACS Med. Chem. Lett. **2** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 849-854.

Di Santo, N. y J. Ehrisman (2014). "A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **768** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 16-21.

Dubreuil, L., I. Houcke, *et al.* (1996). "*In vitro* evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms." Antimicrob. Agents Chemother. **40** (Copyright (C) 2015 American Chemical

Society (ACS). todos los derechos reservados): 2266-2270.

Finegold, S. M., D. Molitoris, *et al.* (2009). "Study of the *in vitro* activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora."

5 Antimicrob. Agents Chemother. **53** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 281 - 286.

Fox, L. M. y L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." Clin. Infect. Dis. **40** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 1173-1180.

10 Hemphill, A., J. Mueller, *et al.* (2006). "Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections." Expert Opin. Pharmacother. **7** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 953-964.

Hoffman, P. S., G. Sisson, *et al.* (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide
15 inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*." Antimicrob. Agents Chemother. **51** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 868-876.

Megraudd, F., A. Occhialini, *et al.* (1998). "Nitazoxanide, a potential drug
20 for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole." Antimicrob. Agents Chemother. **42** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 2836-2840.

Pankuch, G. A. y P. C. Appelbaum (2006). "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents
25 against anaerobic species." Antimicrob. Agents Chemother. **50** (Copyright (C)

2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 1112-1117.

Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." Antiviral Res. **110** (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). todos los derechos reservados): 94-103.

Rossignol, J. F. y R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S.P.R.L. Phavic, Belg. . 11 pp.

Rossignol, J. F. y H. Maisonneuve (1984). "Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections." Am J Trop Med Hyg **33** (Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine): 511-512.