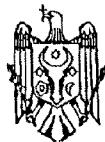




MD/EP 3442580 T2 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3442580 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 45/06 (2006.01.01)  
A61K 31/426 (2006.01.01)  
A61P 1/16 (2006.01.01)  
A61P 11/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2019 0213</p> <p>(22) Data de depozit: 2017.03.13</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17710285.2, 2017.03.13</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3442580, 2019.02.20</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 16305425</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.04.11</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: EP</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30</p> <p>(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 39/2020, 2020.09.23</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2019, 2019.03.31</p>
<p>(71) Solicitant: GENFIT, FR</p> <p>(72) Inventatori: DARTEIL Raphael, FR; WALCZAK Robert, FR; BELANGER Carole, FR; NEGRO Emilie, FR; DAUBERSIES Pierre, FR; DELATAILLE Philippe, FR</p> <p>(73) Titular: GENFIT, FR</p> <p>(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia</p>	

(54) Metode de tratament pentru bolile colestatice și fibrotice

(57) Rezumat:

1  
Invenția de față se referă la compusul [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil]etanoat (Nitazoxanidă) sau 2-hidroxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamidă (Tizoxanidă) pentru tratarea bolilor colestatice și fibrotice.

2  
Secvențe: 4  
Revendicări: 8  
Figuri: 9

MD/EP 3442580 T2 2021.04.30

**(54) Methods of treatment for cholestatic and fibrotic diseases****(57) Abstract:**

The present invention relates to the compound [2-[(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)carbamoyl]phenyl]ethanoate (Nitazoxanide) or 2-hydroxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamide (Tizoxanide) for treating

cholestatic and fibrotic diseases.

Sequences: 4

Claims: 8

Fig.: 9

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL TEHNIC**

5 Prezentă invenție se referă la domeniul medicinei, în special la tratamentul bolilor colestatice sau fibrotice.

**CADRUL INVENȚIEI**

10 Depunerea anormală și exagerată a matricei extracelulare este semnul distinctiv al tuturor bolilor fibrotice, inclusiv a fibrozei hepatice, pulmonare, renale sau cardiace. Spectrul organelor afectate, natura progresivă a procesului fibrotic, numărul mare de persoane afectate și absența unui tratament eficient reprezintă o provocare enormă atunci când se tratează bolile fibrotice.

15 În încercarea de a propune noi strategii terapeutice pentru tratamentul bolilor fibrotice, inventatorii au constatat că compusul 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil] etanoat (Nitazoxanidă sau NTZ), un agent antiprotozoal sintetic, prezintă și proprietăți antifibrotice puternice. Mai mult, evaluarea NTZ într-un model de leziuni hepatice a relevat capacitatea sa de a reduce concentrația de acid biliar circulant, reflectând astfel potențialul său de a trata atât bolile colestatice (cum ar fi PBC și PSC), cât și bolile fibrotice.

20 NTZ, descris pentru prima dată în 1975 (Rossignol și Cavier, 1975), s-a dovedit a fi extrem de eficient împotriva protozoarelor anaerobe, a helminților și a unui spectru larg de microbi, incluzând atât bacteriile anaerobe, cât și bacteriile aere (Rossignol și Maisonneuve, 1984; Dubreuil, Houcke și colab., 1996; Megraud, Occhialini și colab., 1998; Fox și Saravolatz, 2005; Pankuch și Appelbaum, 2006; Finegold, Molitoris și colab., 2009). A fost studiat pentru prima dată la om pentru tratamentul cestodelor intestinale (Rossignol și Maisonneuve, 1984) și este acum autorizat în Statele Unite (laboratoare Alinia®, Romark) pentru tratamentul diareei cauzate de paraziții protozoare *Cryptosporidium parvum* și *Giardia intestinalis*. NTZ a fost, de asemenea, comercializat pe scară largă în America Latină și în India, unde este indicat pentru tratarea unui spectru larg de infecții parazitare intestinale (Hemphill, Mueller și colab., 2006). Mecanismul de acțiune propus prin care NTZ își exercită activitatea antiparazitara este prin inhibarea piruvatului: reacții de transfer de electroni dependente de enzime feredoxin oxidoreductaza (PFOR), care sunt esențiale pentru metabolismul anaerob (Hoffman, Sisson și colab., 2007). NTZ prezintă, de asemenea, activitate împotriva *Mycobacterium tuberculosis*, care nu posedă un omolog al PFOR, sugerând astfel un mecanism alternativ de acțiune. Într-adevăr, s-a demonstrat că NTZ poate acționa și ca un decuplator care perturbă potențialul membranei și homeostazia pH-ului intra-organism (de Carvalho, Darby și colab., 2011).

35 Efectele farmacologice ale NTZ nu se limitează la activitățile sale antiparazitare și, în ultimii ani, mai multe studii au arătat că NTZ poate conferi și activitate antivirală (Di Santo și Ehrisman, 2014; Rossignol, 2014). NTZ interferează cu replicarea virală prin diferite moduri, inclusiv o blocare a maturizării proteinelor hemagglutininei (gripale) sau VP7 (rotavirusului) sau activării proteinei PKR implicată în răspunsul imun înăscut (pentru o revizuire, vezi (Rossignol, 2014)). NTZ s-a arătat, de asemenea, că are proprietăți anticanceroase largi prin interferența cu căile cruciale de semnalizare metabolică și pro-deces (Di Santo și Ehrisman, 2014)

40 În această invenție, utilizând un test de screening fenotipic pentru a identifica potențiali agenți antifibrotici, s-a descoperit că NTZ sau metabolitul său activ Tizoxanidă (sau TZ) interferează cu activarea celulelor stelate hepatice (HSC), care joacă un rol cheie în dezvoltarea fibrozei hepatice. Acest efect a fost total neașteptat, având în vedere proprietățile raportate anterior pentru aceste molecule. Mai mult, NTZ și TZ s-au dovedit a interfera cu activarea fibroblastelor stimulate derivate din alte organe, cum ar fi inima, plămâni și intestinele. Proprietățile antifibrotice ale NTZ au fost confirmate în continuare într-un model preclinic de boală hepatică (NASH indusă de dietă CDAAc), prezentând niveluri semnificative reduse de collagen hepatic și fibroză. În plus față de activitatea sa antifibrotică, s-a demonstrat că NTZ reduce concentrația de acid biliar circulant într-un model de leziuni hepatice induse de CCl4. NTZ și TZ apar astfel drept compuși de interes pentru tratamentul bolilor colestatice și a diverselor tipuri de boli fibrotice.

**REZUMATUL INVENȚIEI**

55 Prezentă invenție se referă la compusul [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil] etanoat (Nitazoxanidă) sau metaboliții săi activi 2-hidroxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamidă (Tizoxanidă), sau glucuronidă de Tizoxanidă (TZG), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei boli colestatice sau fibrotice.

60 Într-un exemplu particular de realizare, tulburarea fibrotică este selectată în grupul format din fibroză la ficat, intestin, rinichi, piele, epidermă, endodermă, mușchi, tendon, cartilaj, inimă, pancreas, plămân, uter, sistem nervos, testicul, penis, ovar, glanda suprarenală, arteră, venă, colon,

intestin (de exemplu, intestin subțire), tract biliar, țesut moale (de exemplu, mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, articulație, fibroză oculară și stomacală. Într-un alt exemplu particular de realizare, tulburarea fibrotică este selectată în grupul format din fibroză la ficat, rinichi, piele, epidermă, endodermă, mușchi, tendon, cartilaj, inimă, pancreas, plămân, uter, sistem nervos, testicul, ovar, glandă suprarenală, arteră, venă, colon, intestin (de exemplu, intestin subțire), tract biliar, țesut moale (de exemplu, mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, articulație și stomac. Într-o altă realizare particulară, tulburarea fibrotică este selectată în grupul constând din fibroză la ficat, intestin, plămân, inimă, rinichi, mușchi, piele, țesut moale, măduvă osoasă, fibroză intestinală și articulară. Într-un alt exemplu de realizare, tulburarea fibrotică este selectată în grupul constând din steatohepatită nealcoolică (NASH), fibroză pulmonară, fibroză pulmonară idiopatică, fibroză a pielii, fibroză oculară (cum ar fi fibroză capsulară), fibroză endomiocardică, fibroză mediastinală, mielofibroză, fibroză retroperitoneală, fibroză masivă progresivă (o complicație a pneumoconiozei muncitorilor în cărbune), fibroză proliferativă, fibroză neoplazică, fibroză pulmonară consecutivă bolii inflamatorii cronice a căilor respiratorii (BPOC, astm, emfizem, plămânul fumătorului, tuberculoză), fibroză hepatică indusă de alcool sau medicamente, ciroză hepatică, fibroză hepatică indusă de infecție, fibroză indusă de radioterapie sau chimioterapie, fibroză sistemică nefrogenă, boala Crohn, colită ulcerativă, cheloidă, infarct miocardic vechi, sclerodermie / scleroză sistemică, artrofibroză, unele forme de capsulită adezivă, colangiopatii fibroase cronice precum Colangită sclerozantă primară (PSC), Colangită biliară primară (PBC), atrezie biliară, colestază intrahepatică familială de tip 3 (PFIC3), fibroză periimplantativă și azbestoză.

Conform unui exemplu particular de realizare a invenției, boala colestatică este selectată în grupul format din colangită biliară primară (PBC), colangită sclerozantă primară (PSC), colestază intrahepatică a sarcinii, colestază intrahepatică familială progresivă, atrezie biliară, colelitiază, colangită infecțioasă, colangită asociată cu histiocitoza celulelor Langerhans, sindrom Alagille, insuficiență ductală nesindromică, colestază indusă de medicamente și colestază asociată nutriției parenterale totale. Într-o concretizare particulară, boala colestatică este PBC.

Conform unui alt aspect, invenția se referă la o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus selectat dintre NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G), pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea unei tulburări colestatice sau fibrotice, în care respectivul compus (compușii) este (sunt) singurul (ele) ingredient (e) activ (e) din compoziție.

Conform unui alt aspect, invenția se referă la compusul sau compoziția farmaceutică definită mai sus, pentru utilizare în tratamentul unei tulburări fibrotice în combinație cu cel puțin un agent activ terapeutic cu activitate antifibrotică cunoscută, selectat dintre pirfenidonă sau inhibitori ai receptorului tirozin kinazei (RTKI), cum ar fi Nintedanib, Sorafenib și alți RTKI, sau blocante ale receptorilor angiotensinei II (AT1), sau inhibitor CTGF sau orice compus antifibrotic susceptibil să interfereze cu căile activate de TGFβ și BMP, inclusiv activatorii complexului TGFβ latent, cum ar fi MMP2, MMP9, THBS1 sau integrine de suprafață celulară, receptori de TGFβ de tip I (TGFBRI) sau de tip II (TGFBRII) și liganzii lor precum TGFβ, Activină, inhibină, Nodal, hormon anti-Mullerian, GDF sau BMP, co-receptori auxiliari (cunoscut și sub numele de receptori de tip III), sau componente ale căii canonice dependente de SMAD, inclusiv proteine SMAD reglatoare sau inhibitoare, sau membri ai căilor necanonice sau independente de SMAD, incluzând diverse ramuri ale semnalizării MAPK, TAK1, căi de semnalizare de GTPază de tip Rho, căi fosfatidilinozitol-3 kinază / AKT, proces EMT indus de TGFβ sau căi de semnalizare Hedgehog canonice și necanonice, inclusiv liganzi Hh sau gene țintă, sau orice membri ai căilor WNT sau Notch care sunt susceptibili să influențeze semnalizarea de TGFβ.

Invenția se referă în plus la compusul sau compoziția farmaceutică definită mai sus, pentru utilizare în combinație cu cel puțin un agent activ terapeutic selectat dintre inhibitori JAK / STAT, alți agenți antiinflamatori și / sau agenți imunosupresori.

Conform unui exemplu particular de realizare, agentul activ terapeutic este selectat dintre glucocorticoizi, NSAIDS, ciclofosamidă, nitrozoree, analogi ai acidului folic, analogi ai purinei, analogi ai pirimidinei, metotrexat, azatioprină, mercaptopurină, ciclosporină, mirocină, tacrolimus, sirolimus, derivați ai acidului micofenolic, fingolimod și alți modulatori ai receptorilor sfingozin-1-fosfat, anticorpi monoclonali și / sau policlonali împotriva unor ținte precum citokinele proinflamatorii și receptorii citokinici proinflamatori, receptorii celulelor T, integrine.

Invenția se referă în plus la o compoziție farmaceutică cuprinzând

- NTZ sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ; și
- TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de TZ(G).

Invenția se referă, de asemenea, la un set de componente care cuprinde:

- NTZ sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ; și
- TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic de TZ(G).

Conform unei variante particulare, in fiecare aspect și exemplu de realizare descris aici, se utilizează NTZ sau TZ, sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ.

#### DESCRIEREA FIGURILOR ȘI TABELELOR

Abrevieri utilizate in figuri, in tabele și în text:

- 5  **$\alpha$ -SMA:** Alfa -actină de mușchi neted  
**BMP:** Proteina morfogenetică osoasă  
**ADNc:** Acid dezoxiribonucleotidic complementar  
**COL1A1:** Colagen, tip 1, Alfa 1  
**CDA:** Dieta definită de L-aminoacizi cu deficit de colină  
10 **CDAc:** Dietă definită de L-aminoacizi cu deficit de colină suplimentată cu colesterol  
**CHOL:** Colesterol  
**CSA:** Dieta definită de L-aminoacizi suplimentată cu colină  
**CYPA:** Ciclofilina A  
**DDC:** 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidină  
15 **DMSO:** Dimetil sulfoxid  
**ELISA:** Test legat de imuno absorbția enzimelor  
**EMT:** Tranziția epitelial-mezenchimală  
**TDI:** Ditiotreitol  
**FBS:** Ser fetal bovin  
20 **FDA:** Administrația pentru alimente și medicamente  
**GDF:** Factori de diferențiere a creșterii  
**Hh:** Arici  
**hHSC:** Celule stelate hepatice umane  
**HSC:** Celule stelate hepatice  
25 **IC<sub>50</sub>:** Concentrația inhibitoare jumătate maximă  
**InMyoFib:** Miofibroblaste intestinale  
**MMP2:** Matrice metalopeptidază 2  
**MMP9:** 9. Matrice metalopeptidază 9  
 **$\mu$ l:** microlitru  
30 **NHLF:** Fibroblaste pulmonare umane normale  
**NTZ:** Nitazoxanidă  
**PBC:** Colangită biliară primară  
**PBS:** Fosfat tampon salin  
**PSC:** Colangită sclerozantă primară  
35 **qPCR:** Reacție în lanț cantitativă a polimerazei  
**pMol:** picomoli  
**rhFGF :** Factor de creștere a fibroblastelor umane de bază recombinant  
**ARN:** Acid ribonucleic  
**RT:** Transcriptaza inversă  
40 **SbBM:** Mediu bazal de celulă musculară netedă  
**SteCGS:** Supliment de creștere a celulelor stelate  
**STeCM:** Mediu celular stelat  
**TBA:** Acizi biliari totali  
**TGF $\beta$ 1:** Factorul de creștere a tumorii beta 1  
45 **TGFBRI:** Receptor TGF $\beta$  tip I.  
**TGFBRII:** Receptor TGF $\beta$  tip II  
**THBS1:** Trombospondină 1  
**TMB:** Tetrametilbenzidină  
**TZ:** Tizoxanidă  
50 **TZG:** Glucuronid de tizoxanidă  
**TZ(G):** TZ sau TZG

#### Figura 1. Nitazoxanida și metabolitul său Tizoxanida inhibă expresia indusă de TGF $\beta$ 1 a proteinei $\alpha$ -SMA in HSC umane

- 55 HSC lipsite de ser au fost preincubate timp de 1 oră cu NTZ (A) sau TZ (B) înainte de activare cu citokina profibrogenă TGF $\beta$ 1 (1ng / ml). După 48 de ore de incubație, expresia de  $\alpha$ -SMA a fost măsurată prin ELISA. Valorile obținute au fost transformate în inhibare procentuală peste controlul TGF $\beta$ 1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate)  $\pm$  deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizand software-ul Sigma Plot 11.0. [\*; p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (in comparație cu grupul TGF $\beta$ 1 1ng / ml)]. Potrivirea curbei și calculul concentrației inhibitorii jumătate maxime (IC<sub>50</sub>) au fost efectuate cu software-ul XLFit 5.3.1.3.
- 60

**Figura 2. Nitazoxanida și metabolitul său Tizoxanida reduc transcrierile COL1A1 în HSC uman indus de TGFβ1**

HSC lipsite de ser au fost preincubate timp de 1 oră cu NTZ (A) sau TZ (B) înainte de activare cu TGFβ1 (1ng / ml). După 24 de ore de incubație, expresia de COL1A1 a fost măsurată prin RT-qPCR. Valorile expresiei au fost transformate în inducție de n-ori față de controlul TGFβ1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate) ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizând software-ul Sigma Plot 11.0. [\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (în comparație cu grupul TGFβ1 1ng / ml)].

**Figura 3: NTZ (A) sau TZ (B) inhibă expresia indusă de TGFβ1 a proteinei α-SMA în HSC de șobolan.**

NTZ (A) sau TZ (B) au fost adăugate la HSC de șobolan lipsit de ser (rHSC) cu 1 oră înainte de activare cu TGFβ1 (3ng / ml). După 48 de ore de incubație, expresia de α-SMA a fost măsurată prin ELISA. Valorile obținute au fost transformate în inhibare procentuală față de controlul TGFβ1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate) ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizând software-ul Sigma Plot 11.0. [\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (în comparație cu grupul TGFβ1 3ng / ml)].

**Figura 4: NTZ(A) sau TZ(B) inhibă expresia indusă de TGFβ1 a proteinei α-SMA în fibroblastele pulmonare umane.**

NTZ (A) sau TZ (B) au fost adăugate la fibroblastele pulmonare lipsite de ser (NHLF) cu 1 oră înainte de activare cu TGFβ1 (1ng / ml). După 48 de ore de incubație, expresia de α-SMA a fost măsurată prin ELISA. Valorile obținute au fost transformate în inhibare procentuală față de controlul TGFβ1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate) ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizând software-ul Sigma Plot 11.0. [\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (în comparație cu grupul TGFβ1 1ng / ml)].

**Figura 5: NTZ (A) sau TZ (B) inhibă expresia indusă de TGFβ1 a proteinei α-SMA în fibroblastele cardiace umane.**

NTZ (A) sau TZ (B) au fost adăugate la fibroblaste cardiace lipsite de ser (NHCF) cu 1 oră înainte de activare cu TGFβ1 (3ng / ml). După 48 de ore de incubație, expresia de α-SMA a fost măsurată prin ELISA. Valorile obținute au fost transformate în inhibare procentuală față de controlul TGFβ1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate) ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizând software-ul Sigma Plot 11.0. [\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (în comparație cu grupul TGFβ1 3ng / ml)].

**Figura 6: NTZ (A) sau TZ (B) inhibă expresia indusă de TGFβ1 a proteinei α-SMA în fibroblastele intestinale umane.**

NTZ (A) sau TZ (B) au fost adăugate la fibroblaste intestinale lipsite de ser (InMyoFib) cu 1 oră înainte de activarea cu TGFβ1 (3ng / ml). După 48 de ore de incubație, expresia de α-SMA a fost măsurată prin ELISA. Valorile obținute au fost transformate în inhibare procentuală față de controlul TGFβ1. Datele sunt prezentate ca medie (triplicate) ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate prin ANOVA unidirecțional, urmate de teste post-hoc Bonferroni, utilizând software-ul Sigma Plot 11.0. [\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001 (în comparație cu grupul TGFβ1 3ng / ml)].

**Figura 7: Administrarea cronică orală de Nitazoxanidă (10 mg / kg / zi) previne stocarea colagenului indusă de CDAA în ficatul șoarecilor C57BI / 6J.**

Șoareci C57BL / 6 în vârstă de 6 săptămâni au fost hrăniți cu o dietă de control (CSAA), dietă CDAA + 1% CHOL (CDAAc) sau dietă CDAAc suplimentată cu NTZ 10 mg / kg / zi timp de 12 săptămâni. După sacrificiu, s-a determinat conținutul de colagen hepatic. Datele sunt prezentate ca medie ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate de un test t student folosind software-ul Sigma Plot 11.0: CSAA vs CDAAc (#: p <0,05; ##: p <0,01; ###: p <0,001) și CDAAc vs NTZ 10 mg / kg / zi (\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001).

**Figura 8: Administrarea cronică orală de Nitazoxanidă (10 mg / kg / zi) previne fibroza indusă de dietă CDAAc în ficatul șoarecilor C57BI / 6J.**

Șoareci C57BL / 6 în vârstă de 6 săptămâni au fost hrăniți cu o dietă de control (CSAA), dietă CDAAc sau dietă CDAAc suplimentată cu NTZ 10 mg / kg / zi timp de 12 săptămâni. După sacrificiu, a fost determinată zona fibrozei hepatice. Datele sunt prezentate ca medie ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate printr-un test t student utilizând software-ul Sigma Plot 11.0: CSAA vs CDAAc (#: p <0,05; ##: p <0,01; ###: p <0,001) și CDAAc vs NTZ 10 mg / kg / zi (\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001).

**Figura 9: Administrarea cronică orală de Nitazoxidă previne nivelurile de concentrație circulantă de TBA induse de CCl4.**

Șobolani de 250-275g au fost injectați intraperitoneal cu ulei de măsline (grupul ctrl) sau cu CCl4 emulsionat în ulei de măsline (CCl4: ulei de măsline 1: 2 v / v, concentrație finală de CCl4: 2 ml / kg) de două ori pe săptămână timp de 3 săptămâni. Concomitent, grupul injectat cu ulei de măsline a fost plasat pe dieta de control, în timp ce grupurile injectate cu CCl4 au fost plasate pe dieta de control sau dieta suplimentată cu NTZ 10 mg / kg / zi sau 30 mg / kg / zi. După sacrificiu, s-a determinat concentrația circulantă de TBA. Datele sunt prezentate ca medie ± deviație standard (SD). Analizele statistice au fost efectuate printr-un test t student, folosind software-ul Sigma Plot 11.0: Ulei de măsline vs CCl4 (#: p <0,05; ##: p <0,01; ###: p <0,001) și CCl4 vs NTZ (\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001).

**DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI**

În partea experimentală a prezentei cereri, se arată că respectiv compușii [2 -[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)carbamoil]fenil] etanoat (Nitazoxidă) și 2-hidroxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamidă (Tizoxidă) au proprietăți anti-fibrotice în mai multe modele de fibroză. Mai mult, se arată că NTZ sau metabolitul său activ TZ au capacitatea de a preveni apariția nivelurilor modificate de acizi biliari circulanți într-un model de leziuni hepatice, arătând capacitatea lui NTZ și TZ de a trata bolile colestactice. În consecință, prezenta invenție se referă la noi utilizări terapeutice ale compusului NTZ sau al unui metabolit activ al acestuia, cum ar fi TZ sau TZG.

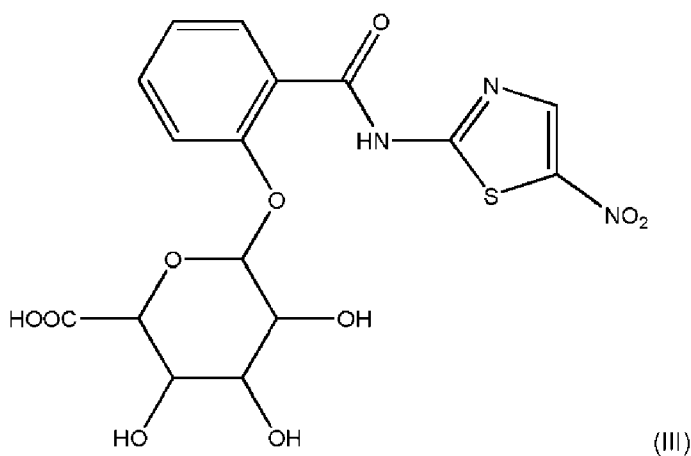
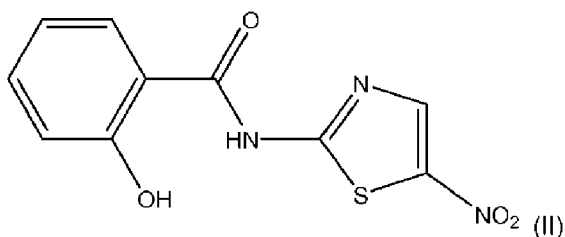
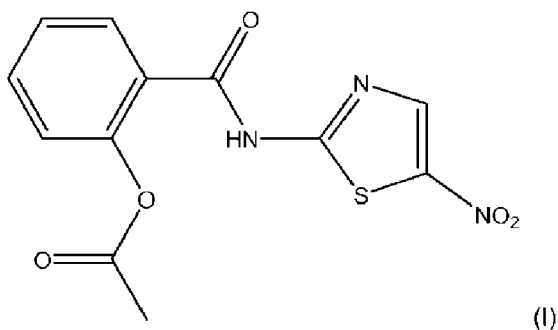
În special, prezenta invenție se referă la compusul NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic a lui NTZ sau TZ(G), pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei tulburări colestactice sau fibrotice. Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică cuprinzând NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei tulburări colestactice sau fibrotice. Mai mult, invenția se referă la utilizarea de NTZ sau TZ(G), sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestora, pentru fabricarea unui medicament util pentru tratamentul unei tulburări colestactice sau fibrotice. Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică cuprinzând NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora. Compoziția farmaceutică conform invenției este utilă pentru tratarea unei tulburări colestactice sau fibrotice.

Deși agenții cauzali sau evenimentele inițiative ale tulburărilor fibrotice sunt destul de diverse și patogeneză lor este variabilă, o caracteristică comună în țesuturile afectate este prezența unui număr mare de fibroblaste activate numite miofibroblaste ((Rosenbloom, Mendoza și colab., 2013)). Stimulul fibrotic, cum ar fi TGFβ1, poate induce diferențierea fibroblastelor la miofibroblaste (Leask și Abraham, 2004; Leask, 2007). Miofibroblastele sunt fibroblaste metabolice și morfologice distincte a căror activare și proliferare joacă un rol cheie în dezvoltarea răspunsului fibrotic. Mai mult, aceste miofibroblaste prezintă funcții biologice unice, inclusiv expresia proteinelor implicate în formarea matricei extracelulare, cum ar fi diferite forme de colagen, fibronectină și alte proteine ECM. Inducerea expresiei actinei musculare netede α (α-SMA) este un semn distinctiv recunoscut al fibroblastului de repaus la diferențierea activată a miofibroblastelor și poate fi utilizată ca citire fiziologică pentru a evalua potența medicamentelor care interferează cu procesul fibrotic. Factorii β de creștere tumorală și, în special, factorul de creștere tumorală beta 1 (TGFβ1) sunt semnale fiziologice recunoscute care induc transformarea fenotipică a fibroblastelor în miofibroblaste profibrotice care exprimă niveluri ridicate de α-SMA și niveluri ridicate de proteine ale matricei extracelulare, care sunt apoi secretate și formează țesutul cicatricial fibrotic.

Mai mult, se știe că proliferarea și activarea fibroblastelor sunt responsabile pentru producerea mai multor componente ale țesutului conjunctiv (de exemplu, colageni, elastină, proteoglicani și hialuronan) care constituie matricea extracelulară (Kendall și Feghali-Bostwick, 2014).

În mod neașteptat, NTZ, dar și metabolitul său activ TZ, dezvăluie proprietăți antifibrotice, deoarece acești compuși au redus în mod dependent nivelul dozei de α-SMA în celulele stelate hepatice induse de TGFβ și în fibroblastele primare din alte organe. Mai mult, tratamentul cu NTZ sau TZ a reprimat și expresia colagenului (Col1a1) în HSC de șobolan activat TGFβ, ceea ce confirmă proprietățile antifibrotice ale ambelor molecule. Activitatea antifibrotică a lui NTZ sau a metabolitului său TZ a fost, de asemenea, demonstrată *in vivo* folosind un model de fibroză hepatică indusă de CDAc, în care au fost exemplificate conținutul redus de colagen hepatic și zona de fibroză diminuată. Mai mult, în modelul de leziuni hepatice indus de CCl4, s-a arătat că NTZ, sau metabolitul său activ TZ, ar putea preveni inducerea nivelurilor de acid biliar circulante, care reprezintă un marker al bolilor colestactice.

NTZ, TZ și TZG care urmează să fie utilizate conform invenției au următoarea formulă (I), (II) și respectiv (III):



5

NTZ și TZ erau cunoscuți pentru activitățile lor antiparazitare și antivirale, dar stadiul tehnicii nu prezintă că NTZ, TZ și TZG au efecte antiolestatice și anti-fibrotice.

Inventatorii au demonstrat într-un mod nou și inventiv că acești compuși au un efect terapeutic în tratamentul colestazei sau fibrozei.

În consecință, invenția se referă la compusul NTZ sau TZ(G) sau la o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G), pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei tulburări colestatice sau fibrotice.

Intr-un alt aspect, invenția se referă la NTZ sau TZ(G), sau la o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G), pentru utilizare în inhibarea proliferării și / sau activării fibroblastelor. După cum se știe în domeniu, fibroblastele sunt responsabile pentru producerea fibrelor de collagen sau a altor componente ale țesutului conjunctiv al matricei extracelulare.

Conform prezentei invenții, termenii „fibroză”, „boală fibrotică”, „tulburare fibrotică” și declinările acestora denotă o stare patologică a depunerii excesive a țesutului conjunctiv fibros într-un organ sau țesut. Mai precis, fibroza este un proces patologic, care include o formare de cicatrice fibrotică persistentă și o supraproducție a matricei extracelulare de către țesutul conjunctiv, ca răspuns la deteriorarea țesutului. Fiziologic, depunerea țesutului conjunctiv poate distruge arhitectura și funcția organului sau a țesutului subiacent.

Conform prezentei invenții, fibroza sau tulburarea fibrotică poate fi asociată cu orice fibroză de organ sau țesut. Exemple ilustrative, nelimitative, de fibroză organică particulară includ fibroza la ficat, intestin, rinichi, piele, epidermă, endoderm, mușchi, tendon, cartilaj, inimă, pancreas, plămân, uter, sistem nervos, testicul, penis, ovar, glanda suprarenală, arteră, venă, colon, intestin (de exemplu, intestin subțire), tract biliar, țesut moale (de exemplu, mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, fibroză articulară sau stomacală, în special fibroză la ficat, rinichi, piele, epidermă, endoderm, mușchi, tendon, cartilaj, inimă, pancreas, plămân, uter, sistem nervos, testicul, ovar, glanda suprarenală, arteră, venă, colon, intestin (de exemplu, intestin subțire), tract

30

biliar, țesut moale (de exemplu mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, fibroză articulară sau stomacală.

Conform prezentei invenții, termenii „colestază” sau „boală colestatică” sau „tulburare colestatică” și declinările acestora denotă o afecțiune patologică definită de o scădere a fluxului biliar datorită secreției afectate de către hepatocite sau obstrucției fluxului biliar prin căile biliare intra- sau extra-hepatice. Prin urmare, definiția clinică a colestazei este orice afecțiune în care sunt reținute substanțele excretate în mod normal în bilă.

Intr-un exemplu particular de realizare, tulburarea fibrotică este selectată din grupul constând din fibroză la ficat, intestin, plămân, inimă, rinichi, mușchi, piele, țesut moale (de exemplu, mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, intestin și fibroză articulară (de exemplu, la genunchi, umăr sau alte articulații).

Intr-un exemplu particular de realizare, tulburarea fibrotică este selectată din grupul constând din fibroză hepatică, pulmonară, cutanată, renală și intestinală.

Intr-o variantă mai preferată a prezentei invenții, tulburarea fibrotică tratată este selectată în grupul constând din următoarea listă neexhaustivă a tulburărilor fibrotice: steatohepatită nealcoolică (NASH), fibroză pulmonară, fibroză pulmonară idiopatică, fibroză cutanată, fibroză oculară, fibroză endomiocardică, fibroză mediastinală, mielofibroză, fibroză retroperitoneală, fibroză masivă progresivă (o complicație a pneumoconiozei muncitorilor din cărbune), fibroză proliferativă, fibroză neoplazică, fibroză pulmonară consecutivă bolii inflamatorii cronice a căilor respiratorii (BPOC, astm, emfizem, plămânul fumătorului, tuberculoză), fibroză hepatică indusă de alcool sau medicamente, ciroză hepatică, fibroză hepatică indusă de infecție, fibroză indusă de radiații sau chimioterapie, fibroză sistemică nefrogenă, boala Crohn, colită ulcerativă, keloid, infarct miocardic vechi, sclerodermie / scleroză sistemică, artrofibroză, unele forme de capsulită adezivă, colangiopatii cronice fibroase precum colangită sclerozantă primară (PSC) și colangită biliară primară (PBC), atrezie biliară, colestază intrahepatică familială de tip 3 (PFIC3), fibroză periimplantativă și azbestoză.

Conform unei concretizări particulare a invenției, boala colestatică este selectată din grupul format din colangită biliară primară (PBC), colangită sclerozantă primară (PSC), colestază intrahepatică a sarcinii, colestază intrahepatică familială progresivă, atrezie biliară, colelitiază, colangită infecțioasă, colangita asociată cu histiocitoza celulelor Langerhans, sindromul Alagille, insuficiență ductală nesindromică, colestază indusă de medicamente și colestază asociată nutriției parenterale totale. Intr-o realizare preferată, boala colestatică este PBC sau PSC, în special PBC.

Termenul „tratament” sau „tratare” se referă la tratamentul curativ sau preventiv al unei tulburări colestatice sau fibrotice la un subiect care are nevoie de aceasta. Tratamentul implică administrarea compusului, în special cuprins într-o compoziție farmaceutică, unui subiect care are o tulburare declarată, adică unui pacient, pentru a vindeca, întârzia, inversa sau încetini progresia tulburării, îmbunătățind astfel starea subiectului. Un tratament poate fi administrat, de asemenea, unui subiect sănătos sau cu risc de a dezvolta o tulburare colestatică sau fibrotică, pentru a preveni sau a întârzia tulburarea.

Prin urmare, conform invenției, tratamentul unei tulburări fibrotice implică administrarea de NTZ sau TZ(G), sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestora, sau a unei compoziții farmaceutice care le conține, la un subiect care are o tulburare declarată pentru a vindeca, întârzia, inversa sau încetini progresia tulburării, îmbunătățind astfel starea pacientului, sau la un subiect sănătos, în special un subiect care prezintă riscul de a dezvolta o tulburare colestatică sau fibrotică.

Subiectul care trebuie tratat este un mamifer, de preferință un om. Subiectul care urmează a fi tratat conform invenției poate fi selectat pe baza mai multor criterii asociate bolilor colestatice sau fibrotice, cum ar fi tratamentele medicamentoase anterioare, patologiiile asociate, genotipul, expunerea la factori de risc, infecția virală, precum și pe baza detectarea oricărui biomarker relevant care poate fi evaluat prin metode imagistice și metode imunologice, biochimice, enzimatic, chimice sau de detectare a acidului nucleic.

Sinteza de NTZ sau TZ poate fi realizată, de exemplu, așa cum este descris de Rossignol și Cavier, 1975, sau prin orice alt mod de sinteză cunoscut de o persoană de specialitate în domeniu. TZG poate fi sintetizat, de exemplu, conform modului de sinteză cunoscut în domeniu, cum ar fi în Wadouachi 2011. S'agit-il de A Wadouachi, J Kovensky, Synthesis of Glycosides of Glucuronic, Galacturonic and Mannuronic Acids: An Overview, Molecules, 2011, 16 (5), 3933-3968.

Intr-un exemplu particular de realizare, tratamentul unei tulburări colestatice sau fibrotice poate cuprinde administrarea unei combinații de NTZ și TZ(G), sau de o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ și TZ(G). Conform unei variante a acestui exemplu de realizare, atât NTZ cât și TZ(G) sunt cuprinse împreună într-o singură compoziție.

Intr-o altă variantă a acestui exemplu de realizare, NTZ și TZ(G) sunt pentru administrare simultană, secvențială sau separată în terapie, prin urmare fiind posibil incluse în diferite compoziții. În cazul administrării secvențiale, NTZ poate fi administrat înainte de administrarea de TZ(G), sau TZ(G) poate fi administrat înainte de administrarea de NTZ. Ca atare, invenția se referă, de asemenea, la un set de componente cuprinzând (i) NTZ sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, sau o compoziție farmaceutică cuprinzând NTZ sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia; și (ii) TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, sau o compoziție farmaceutică cuprinzând TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru administrare simultană, secvențială sau separată.

NTZ sau TZ(G) pot fi formulate ca săruri acceptabile farmaceutic, în special săruri acide sau bazice compatibile cu utilizarea farmaceutică. Sărurile de NTZ și TZ(G) includ săruri de aditie acidă acceptabile farmaceutic, săruri de aditie bazice acceptabile farmaceutic, săruri metalice acceptabile farmaceutic, săruri de amoniu și amoniu alchilat. Aceste săruri pot fi obținute în timpul etapei finale de purificare a compusului sau prin incorporarea sării în compusul purificat anterior.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus selectat dintre NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G), pentru utilizare într-o metodă de tratament a unei boli colestactice sau fibrotice.

Compoziția farmaceutică cuprinzând NTZ sau TZ(G), în special pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei tulburări colestactice sau fibrotice, poate cuprinde, de asemenea, unul sau mai mulți excipienți sau vehicule acceptabile farmaceutic (de exemplu, soluții saline, soluții fiziologice, soluții izotonice, etc., compatibile cu utilizarea farmaceutică și bine cunoscute de către un specialist în domeniu).

Aceste compoziții pot cuprinde, de asemenea, unul sau mai mulți agenți sau vehicule aleși dintre dispersanți, solubilizatori, stabilizatori, conservanți, etc. Agenții sau vehiculele utile pentru aceste formulări (lichide și/sau injectabile și/sau solide) sunt deosebi metilceluloză, hidroximetilceluloză, carboximetilceluloză, polisorbit 80, manitol, gelatină, lactoză, uleiuri vegetale, acacia, lipozomi etc.

Aceste compoziții pot fi formulate sub formă de suspensii injectabile, siropuri, geluri, uleiuri, unguente, pastile, tablete, supozitoare, pulberi, capsule de gel, capsule, aerosoli etc., eventual prin intermediul unor forme galenice sau dispozitive care asigură o eliberare prelungită / sau lentă. Pentru acest tip de formulări, pot fi utilizați în mod avantajos agenți precum celuloză, carbonați sau amidon.

NTZ sau TZ(G) pot fi administrate pe căi diferite și sub diferite forme. De exemplu, compusul (compușii) se poate (pot) administra printr-un mod sistemic, per os, parenteral, prin inhalare, prin pulverizare nazală, prin instalație nazală sau prin injecție, cum ar fi, de exemplu, intravenos, pe cale intramusculară, pe cale subcutanată, pe cale transdermică, pe cale topică, pe cale intra-arterială etc.

Desigur, calea de administrare va fi adaptată la forma de NTZ sau TZ(G), conform procedurilor bine cunoscute de către specialiștii în domeniu.

Intr-un exemplu particular de realizare, compusul este formulat ca o tabletă. Într-o altă realizare particulară, compusul este administrat oral.

NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, se administrează într-o cantitate eficientă terapeutic. În contextul invenției, termenul „cantitate eficientă” se referă la o cantitate de compus suficientă pentru a produce efectul terapeutic dorit.

Frecvența și / sau doza relativă la administrare pot fi adaptate de către un specialist în domeniu, în funcție de pacient, patologie, forma de administrare etc. De obicei, NTZ sau TZ(G) pot fi administrate pentru tratamentul unei boli colestactice sau fibrotice la o doză cuprinsă între 0,01 mg / zi până la 4000 mg / zi, cum ar fi de la 50 mg / zi la 2000 mg / zi, cum ar fi de la 100 mg / zi la 2000 mg / zi; și în special, de la 100 mg / zi la 1000 mg / zi. Într-o variantă particulară, NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, se administrează la o doză de aproximativ 1000 mg / zi (adică la o doză de 900 până la 1100 mg / zi), în special la 1000 mg / zi. Într-o variantă particulară, NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, se administrează pe cale orală la o doză de aproximativ 1000 mg / zi, în special la 1000 mg / zi, în special sub formă de tabletă. Administrarea poate fi efectuată zilnic sau chiar de mai multe ori pe zi, dacă este necesar. Într-un exemplu de realizare, compusul este administrat cel puțin o dată pe zi, cum ar fi o dată pe zi, de două ori pe zi, sau de trei ori pe zi. Într-o variantă particulară, compusul este administrat o dată sau de două ori pe zi. În special, administrarea orală poate fi efectuată o dată pe zi, în timpul unei mese, de exemplu în timpul micului dejun, pranzului sau cinei, prin administrarea unei tablete care conține compusul la o doză de aproximativ 1000 mg, în special la o doză de 1000 mg. Într-un alt exemplu de realizare, o tabletă este administrată oral de două ori pe zi, cum ar fi prin administrarea unui prim comprimat care cuprinde compusul la o doză de

aproximativ 500 mg (adică la o doză de 450 până la 550 mg), în special la o doză de 500 mg, în timpul unei mese, și administrarea unui al doilea comprimat cuprinzând compusul la o doză de aproximativ 500 mg, în special la o doză de 500 mg, în timpul unei alte mese, în aceeași zi.

5 În mod adecvat, durata tratamentului cu NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora este de cel puțin 1 săptămână, în special pentru cel puțin 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 sau 24 săptămâni sau mai mult. În special, durata tratamentului cu NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora este de cel puțin 1 an, 2 ani, 3 ani, 4 ani sau cel puțin 5 ani.

10 Intr-un exemplu de realizare particular, invenția se referă la tratamentul unei boli colestactice sau fibrotice, în special fibroza hepatică, mai ales fibroza hepatică consecutivă NASH, la un pacient care are nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea pacientului menționat o cantitate eficientă terapeutic de NTZ sau TZ(G) sau a unei sări acceptabile farmaceutic de NTZ sau TZ(G), în special administrarea de NTZ la o doză de 1000 mg / zi, în special prin administrarea unei tablete care conține 500 mg NTZ de două ori pe zi, în special în timpul a două mese diferite.

15 Intr-un exemplu de realizare particular, invenția se referă la NTZ sau TZ(G) sau la o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G) pentru utilizare în tratamentul unei boli colestactice sau fibrotice, în combinație cu cel puțin un alt agent terapeutic activ cu activitate antifibrotică cunoscută. Conform unei variante a acestui exemplu de realizare, NTZ sau TZ(G) pot fi combinate  
20 cu orice compus antifibrotic, cum ar fi pirfenidona sau inhibitori ai receptorului tirozin kinazei (RTKI), cum ar fi Nintedanib, sorafenib și alți RTKI, sau blocați ai receptorilor angiotensinei II (AT1), sau inhibitor CTGF sau orice compus antifibrotic susceptibil să interfereze cu căile activate de TGFβ și BMP, inclusiv activatori ai complexului latent TGFβ, cum ar fi MMP2, MMP9, THBS1 sau integrine de suprafață celulară, receptori TGFβ tip I (TGFBRI) sau tip II (TGFBRII) și  
25 liganzii acestora, cum ar fi TGFβ, Activină, inhibină, Nodal, hormon anti-Mullerian, GDF sau BMP, co-receptori auxiliari (cunoscuți și ca receptori de tip III) sau componente ale căii canonice dependente de SMAD, inclusiv proteine SMAD inhibitoare sau de reglare, sau membri ai căilor necanonice sau independente de SMAD, incluzând diferite ramuri ale semnalizării MAPK, TAK1, căi de semnalizare GTPază de tip Rho, căi fosfatidilinozitol-3 kinază / AKT, proces EMT indus de TGFβ, sau căi de semnalizare Hedgehog canonice și necanonice incluzând liganzi Hh sau gene țintă, sau orice membri ai WNT, sau căi Notch care sunt susceptibile să influențeze semnalizarea TGFβ.

Astfel, invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus selectat dintre NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau de TZ(G),  
35 în combinație cu cel puțin un agent terapeutic activ cu activitate antifibrotică cunoscută, selectat dintre pirfenidonă sau inhibitori ai receptorului tirozin kinazei (RTKI), cum ar fi Nintedanib, sorafenib și alți RTKI, sau blocați ai receptorilor angiotensinei II (AT1) sau inhibitori CTGF sau compus antifibrotic susceptibil să interfereze cu căile TGFβ și BMP, inclusiv activatorii ai complexului TGFβ latent, cum ar fi MMP2, MMP9, THBS1 sau integrine de suprafață celulară, receptori TGFβ de tip I (TGFBRI) sau de tip II (TGFBRII) și liganzii acestora, cum ar fi TGFβ,  
40 Activină, inhibină, Nodal, hormon anti-Mullerian, GDF sau BMP, co-receptori auxiliari (cunoscuți și ca receptori de tip III), sau componente ale căii canonice dependente de SMAD, inclusiv proteine SMAD reglatoare sau inhibitoare, sau membri ai căilor necanonice sau independente de SMAD, incluzând diferite ramuri ale semnalizării MAPK, TAK1, căi de semnalizare GTPază de tip Rho, căi fosfatidilinozitol-3 kinază / AKT, proces EMT indus de TGFβ, sau căi de semnalizare  
45 Hedgehog canonice și necanonice incluzând liganzi Hh sau gene țintă, sau orice membri ai WNT, sau căi Notch, care sunt susceptibili să influențeze semnalizarea TGFβ, pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea unei tulburări fibrotice.

Intr-un alt exemplu de realizare particular, alte clase de molecule care ar putea fi combinate, de asemenea, cu NTZ sau TZ(G) includ inhibitori JAK / STAT sau alți agenți  
50 antiinflamatori și / sau imunosupresori. O listă neexhaustivă a acestor agenți include, dar nu se limitează la glucocorticoizi, NSAIDS, ciclofosamidă, nitrozoree, analogi ai acidului folic, analogi ai purinei, analogi ai pirimidinei, metotrexat, azatioprină, mercaptopurină, ciclosporină, miriocrină, tacrolimus, sirolimus, derivați de acid micofenolic, fingolimod și alți modulatori ai receptorilor sfinzozin-1-fosfat, anticorpi monoclonali și / sau policlonali împotriva unor ținte precum  
55 citokinele proinflamatorii și receptorii citokinici proinflamatori, receptori celulelor T, integrine. Alte clase de molecule care ar putea fi combinate, de asemenea, cu NTZ sau TZ(G) includ molecule care ar putea spori potențial expunerea sau efectul NTZ sau TZ(G).

Intr-un alt exemplu de realizare particular, invenția se referă la o combinație de NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora cu cel puțin un alt agent activ terapeutic cu  
60 activitate antifibrotică cunoscută, sau cu inhibitori JAK / STAT, sau alți antiinflamatori și / sau agenți imunosupresori. Combinația poate fi sub forma unei singure compoziții farmaceutice

cuprinzand diferitele ingrediente active, inclusiv NTZ, TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora. Intr-o variantă, combinația este un set de componente care conțin NTZ, TZ(G) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora și un alt ingredient activ, cum ar fi un alt agent anti-fibrotic, un inhibitor JAK / STAT sau un alt antiinflamator sau agent imunosupresor. Setul respectiv de componente poate fi pentru administrare simultană, separată sau secvențială pentru tratamentul unei tulburări colestactice sau fibrotice.

Intr-un alt exemplu de realizare, compusul NTZ sau TZ(G), sau o combinație de NTZ și TZ(G), este administrat ca unic ingredient activ. In consecință, invenția se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus selectat dintre NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau de TZ(G), sau un amestec al acestora, pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea unei tulburări colestactice sau fibrotice, în care compusul (compușii) menționat (i) este (sunt) singurul ingredient activ în compoziție.

Intr-un alt exemplu de realizare, prezenta invenție dezvăluie tratamentul bolilor colestactice sau fibrotice care cuprind administrarea de NTZ sau TZ(G), sau o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ(G), in special sub forma unei compoziții farmaceutice care conține NTZ sau TZ.

Intr-un alt aspect, dezvăluirea se referă la un set de componente care cuprinde:

- Nitazoxanidă sau o sare acceptabilă farmaceutic a Nitazoxanidei; și
- Tizoxanidă sau o sare acceptabilă farmaceutic a Tizoxanidei.

Compușii din trusa de componente ale dezvăluirii sunt administrați simultan, separat sau secvențial pentru tratamentul unei tulburări fibrotice.

Intr-un alt exemplu de realizare, invenția dezvăluie tratamentul unei boli colestactice și / sau fibrotice care cuprinde administrarea de două ori pe zi, la un pacient care are nevoie de aceasta, având o boală colestactică sau fibrotică (în special unui pacient cu NASH sau unui pacient cu fibroză hepatică), a unui comprimat care conține 500 mg de NTZ, în special în timpul unei mese (cum ar fi în timpul micului dejun, pranzului sau cinei).

Invenția este descrisă în continuare cu referire la următoarele exemple nelimitative.

#### **EXEMPLE**

##### **Materiale și metode**

Compușii au fost dizolvați în dimetil sulfoxid (DMSO, Fluka cat # 41640). Nitazoxanida (INTERCHIM cat # RQ550U) și Tizoxanida (INTERCHIM cat # RP253) au fost obținute comercial.

##### **Cultura de hHSC**

Celulele stelate hepatice primare umane (hHSC) (Innoprot) au fost cultivate in mediu STeCM (ScienCell cat # 5301) care a fost suplimentată cu 2% ser fetal bovin (FBS, ScienCell cat # 0010), 1% penicilină / streptomycină (ScienCell cat # 0503) și supliment de creștere a celulelor stelate (SteCGS; ScienCell cat# 5352). Baloanele de cultură celulară au fost acoperite cu poli-L lizină (Sigma cat # P4707) pentru o mai bună aderență.

##### **Activarea de hHSC cu TGF-β1**

Celulele stelate hepatice primare umane (hHSC) (Innoprot) au fost cultivate in condiții standard, așa cum s-a descris mai sus. Celulele au fost ulterior placate la o densitate de  $7 \times 10^4$  celule / godeu în plăci cu 24 de godeuri pentru studii de expresie genică, și la o densitate de  $2 \times 10^4$  celule / godeu în plăci cu 96 de godeuri pentru măsurarea  $\alpha$ -SMA prin ELISA. A doua zi, mediul de cultură celulară a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen cat # 14190). hHSC au fost private timp de 24 de ore în mediu fără ser și fără SteCGS. Pentru tratamentele cu NTZ sau TZ, hHSC lipsit de ser a fost preincubat timp de 1 oră cu compușii, urmat de adăugarea stimulilor profibrogeni TGFβ1 (PeproTech cat# 100-21, 1ng / ml) in ser și mediu fără SteCGS pentru o perioadă suplimentară de 24 sau 48 de ore (momentul în timp este indicat în legendele figurii). La sfârșitul tratamentului, celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen, cat # 14190) înainte de adăugarea a 50 μl de tampon de liză (reactiv MT CellLytic™; Sigma # C3228). Plăcile au fost apoi incubate timp de 30 de minute pe gheață folosind un agitator de plăci, înainte de depozitare la  $-20^\circ\text{C}$ .

##### **Activarea de HSC de șobolan cu TGFβ1:**

Celulele stelate hepatice primare de șobolan (rHSC) (Innoprot) au fost cultivate în mediu STeCM (ScienCell cat# 5301) care a fost suplimentată cu 2% ser fetal bovin (FBS, ScienCell cat# 0010), 1% penicilină / streptomycină (ScienCell cat# 0503) și supliment de creștere a celulelor stelate (SteCGS; ScienCell cat# 5352). Pentru experimentele de activare cu TGFβ1, rHSC au fost placate la o densitate de  $10 \times 10^3$  celule pe godeu în plăci cu 96 de godeuri. A doua zi, mediul de cultură celulară a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen cat# 14190). rHSC au fost private timp de 24 de ore în mediu fără ser și fără SteCGS. Pentru tratamentele cu NTZ sau TZ, rHSC lipsit de ser a fost preincubat timp de 1 oră cu compușii, urmat de adăugarea stimulilor

profibrogeni TGFβ1 (PeproTech cat# 100-21, 3ng / mL) în mediu fără ser și fără SteCGS pentru o perioadă suplimentară de 48 de ore. La sfârșitul tratamentului, celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen, cat # 14190) înainte de adăugarea a 50 μl de tampon de liză (reactiv MT CellLytic™; Sigma # C3228). Plăcile au fost apoi incubate timp de 30 de minute pe gheață folosind un agitator de plăci, înainte de depozitare la -20 ° C.

5

#### Activarea de NHLF cu TGFβ1

Fibroblastele pulmonare umane normale (NHLF) (Lonza) au fost cultivate în mediu bazal de fibroblaste (FBM) (Lonza cat # CC-3131) care a fost completat cu kitul FGM-2 SingleQuots™ (Lonza cat # CC-3132). Mediul complet conține 2% ser fetal bovin. Pentru experimentele de activare cu TGFβ1, NHLF au fost placcate la o densitate de  $5 \times 10^3$  celule pe godeu în plăci cu 96 de godeuri. A doua zi, mediul de cultură celulară a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen cat # 14190). NHLF au fost private timp de 24 de ore în mediu fără ser, fără insulină și fără rhFGF-B. Pentru tratamentele cu NTZ sau TZ, NHLF lipsit de ser a fost preincubat timp de 1 oră cu compușii, urmat de adăugarea stimulilor profibrogeni TGFβ1 (PeproTech cat# 100-21, 1ng / ml) în ser, fără insulină și mediu fără rhFGF-B pentru o perioadă suplimentară de 48 de ore. La sfârșitul tratamentului, celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen, cat # 14190) înainte de adăugarea a 50 μl de tampon de liză (reactiv MT CellLytic™; Sigma # C3228). Plăcile au fost apoi incubate timp de 30 de minute pe gheață folosind un agitator de plăci, înainte de depozitare la -20 ° C.

10

15

20

#### Activarea de NHCF-V cu TGFβ1:

Fibroblastele cardiace umane normale (ventriculul) (NHCF-V) (Lonza) au fost izolate din țesutul normal al inimii adulte. Celulele au fost cultivate în Fibroblast Basal Medium (FBM) (Lonza cat # CC-3131) care a fost suplimentat cu trusa FGM™-3 BulletKit™ (Lonza cat # CC-4525). Mediul complet conține 10% ser bovin fetal. Pentru experimentele de activare cu TGFβ1, NHCF-V au fost placcate la o densitate de  $6 \times 10^3$  celule pe godeu în plăci cu 96 de godeuri. A doua zi, mediul de cultură celulară a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen cat # 14190). NHCF au fost private timp de 24 de ore în mediu fără ser, fără insulină și fără rhFGF-B. Pentru tratamentele cu NTZ sau TZ, NHCF lipsit de ser a fost preincubat timp de 1 oră cu compușii, urmat de adăugarea stimulului profibrogen TGFβ1 (PeproTech cat# 100-21, 3ng / ml) în ser, fără insulină și mediu fără rhFGF-B pentru o perioadă suplimentară de 48 de ore. La sfârșitul tratamentului, celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen, cat # 14190) înainte de adăugarea a 50 μl de tampon de liză (reactiv MT CellLytic™; Sigma # C3228). Plăcile au fost apoi incubate timp de 30 de minute pe gheață folosind un agitator de plăci, înainte de depozitare la -20 ° C.

25

30

#### Activarea de InMyoFib cu TGFβ1:

Miofibroblastele intestinale umane (InMyoFib) (Lonza) au fost cultivate în mediu bazal cu celule musculare netede (SmBM-2TM) (Lonza cat# CC-3181) care a fost completat cu SmGMTM-2 BulletKit™ (Lonza cat# CC-4149). Mediul complet conține 5% ser fetal bovin. Pentru experimentele de activare cu TGFβ1, InMyoFib au fost placcate la o densitate de  $10 \times 10^3$  celule pe godeu în plăci cu 96 de godeuri. A doua zi, mediul de cultură celulară a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen cat # 14190). InMyoFib au fost private timp de 24 de ore în mediu fără ser, insulină și rhFGF-B. Pentru tratamentele cu NTZ sau TZ, InMyoFib lipsit de ser a fost preincubat timp de 1 oră cu compușii, urmat de adăugarea stimulilor profibrogeni TGFβ1 (PeproTech cat# 100-21, 3ng / ml) în ser, fără insulină și mediu fără rhFGF-B pentru o perioadă suplimentară de 48 de ore. La sfârșitul tratamentului, celulele au fost spălate cu PBS (Invitrogen, cat # 14190) înainte de adăugarea a 50 μl de tampon de liză (reactiv MT CellLytic™; Sigma # C3228). Plăcile au fost apoi incubate timp de 30 de minute pe gheață folosind un agitator de plăci, înainte de depozitare la -20 ° C.

35

40

45

#### α-SMA ELISA

Nivelul de α-SMA a fost măsurat folosind un ELISA Sandwich. Pe scurt, godeurile unei plăci ELISA au fost acoperite mai întâi cu anticorpul de captură (anti-ACTA2 monoclonal de șoarece, Abnova) la 4 ° C peste noapte. După 3 spălări în PBS + 0,2% Tween 20, s-a adăugat o soluție de blocare constând din PBS + 0,2% BSA timp de o oră, urmată de un alt ciclu de spălare. Lizatele celulare au fost transferate în godeuri pentru legarea la anticorpul de captură pentru o perioadă de 2 ore la temperatura camerei. După procedura de spălare, anticorpul de detectare (anti-ACTA2 monoclonal de șoarece biotinitat, Abnova) a fost adăugat timp de 2 ore la temperatura camerei, urmat de 3 spălări. Pentru detectare, a fost aplicată mai întâi o Streptavidină conjugată cu HRP (R&D Systems cat # DY998) timp de 30 de minute la temperatura camerei. După spălare, s-a adăugat substratul HRP TMB (BD, # 555214) și s-a incubat timp de 7 minute la temperatura camerei în întuneric. La oxidare, TMB formează un produs de reacție albastru solubil în apă, care devine galben cu adăugarea de acid sulfuric (oprirea soluției), permițând măsurarea precisă a

50

55

60

intensității la 450 nm folosind un spectrofotometru. Culoarea dezvoltată este direct proporțională cu cantitatea de  $\alpha$ -SMA prezentă în lizat.

#### Expresia genelor

ARN-ul total a fost izolat folosind ARN-ul Nucleospin® 96 (Macherey Nagel) urmand instrucțiunile producătorului. ARN-ul total (500ng pentru probe *in vitro*) a fost transcris invers în ADNc utilizand M-MLV RT (Transcriptaza inversă a virusului leucemiei murinice Moloney) (Invitrogen cat # 28025) în tampon 1X RT (Invitrogen), 1mM DTT (Invitrogen), 0,18 mM dNTPs (Promega), 200ng pdN6 ( Amersham) și 30U de inhibitor de RNază (Promega).

PCR cantitativă a fost apoi realizată utilizând sistemul MyiQ monocolor în timp real de detectare PCR (Biorad). Pe scurt, reacțiile PCR au fost efectuate în format 96-WP în 25 ul din volumul total conținând 1μl de reacție de transcripție inversă, 0,5μl de primeri invers și înainte (10 pmol fiecare) și 12,5 μl de 2X iQ SYBR Green Supermix (BioRad, 1725006CUST). Secvențele primerilor sunt prezentate în tabelul 1

Tabelul 1: Primeri umani

Denumire primer	Secvență (5' -> 3')
36B4 înainte	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC (ID SECV NR. 1)
36B4 invers	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG (ID SECV NR. 2)
COL1A1 înainte	AGGCGAACAAGGTGACAGAG (ID SECV NR. 3)
COL1A1 invers	GCCAGGAGAACCAGCAGAG (SECV ID NR. 4)

15

Nivelurile de expresie au fost normalizate folosind expresia genei 36B4 ca referință în probele umane.

Pentru fiecare genă, curbele standard au fost trasate selectand cele mai bune puncte (cel puțin trei puncte) pentru a avea eficiența reacției PCR aproape de 100% și un coeficient de corelație apropiat de 1. Nivelurile de expresie au fost determinate folosind ecuația curbei standard pentru ambele gena menajului și gena țintă (luând în considerare eficiența PCR specifică fiecărei gene țintă).

#### Evaluarea de NTZ într-un model cronic de fibroză hepatică indusă de dietă CDAAc

Efectul antifibrotic al NTZ a fost evaluat într-un model murin de fibroză hepatică experimentală indusă de dietă CDAAc. Șoarecii C57BL / 6 în vârstă de 6 săptămâni au fost hrăniți timp de 12 săptămâni cu o dietă martor (CSAA), dietă CDAAc sau dietă CDAAc suplimentată cu NTZ 10 mg / kg / zi timp de 12 săptămâni.

Greutatea corporală și aportul de alimente au fost monitorizate de două ori pe săptămână. În ultima zi de tratament, șoarecii au fost sacrificați după o perioadă de post de 6 ore. Ficatul a fost rapid excizat pentru studii biochimice și histologice.

Toate procedurile la animale au fost efectuate conform protocoalelor standard și în conformitate cu recomandările standard pentru îngrijirea și utilizarea corespunzătoare a animalelor de laborator.

#### Evaluarea de NTZ în modelul de leziuni hepatice induse de CCl4

35 Efectul antifibrotic al NTZ a fost evaluat într-un model de șobolan cu leziuni hepatice induse de CCl4.

OFA S; Șobolanii Dawley (greutatea corporală inițială 250-275g) au fost randomizați în funcție de greutatea lor corporală în 4 grupuri și tratați timp de 3 săptămâni. Șobolanii au fost injectați intraperitoneal cu ulei de măsline (grupul ctrl) sau cu CCl4 emulsionat în ulei de măsline (CCl4: ulei de măsline 1: 2 v / v, concentrație finală de CCl4: 2 ml / kg) de două ori pe săptămână. Concomitent, grupul injectat cu ulei de măsline a fost plasat pe dieta de control, în timp ce grupurile injectate cu CCl4 au fost plasate pe dieta de control sau dieta suplimentată cu NTZ. Au fost preparate 2 regimuri care conțin NTZ, corespunzător unei expuneri de 10 sau 30 mg / kg / zi. În ultima zi de tratament, șobolanii au fost sacrificați după o perioadă de 6 ore de post. Probele de sange au fost colectate și serul a fost izolat pentru analize biochimice.

#### Evaluarea de NTZ în modelul DDC al colestazei:

Șoarecii C57BL / 6 vor fi hrăniți timp de 8 săptămâni o dietă suplimentată cu 0,1% DDC sau 0,1% dietă suplimentată cu DDC care conține NTZ 100 mg / kg / zi sau o dietă standard pentru șoareci (Ssniff). În ultima zi de tratament, șoarecii vor fi sacrificați după o perioadă de post de 6 ore. Probele de sange vor fi prelevate pentru analize biochimice, iar ficatul va fi rapid excizat pentru studii biochimice și histologice.

#### **Evaluarea de NTZ intr-un model de fibroză hepatică indusă de CCl4**

Șoarecii C57BL / 6 de 9 săptămâni vor fi puși pe dietă de control sau dietă suplimentată cu NTZ timp de 6 săptămâni. Se vor pregăti 2 regimuri care conțin NTZ corespunzător unei expunerii de NTZ de 30 sau 100 mg / kg / zi. Concomitent, și pentru durata totală de 6 săptămâni, șoarecii vor fi tratați de 3 ori pe săptămână cu CCl4 dizolvat în ulei de măsline sau vehicul prin gavaj oral. Cantitatea de CCl4 va fi crescută progresiv de la 0,875 ml / kg la 2,5 ml / kg. În ultima zi de tratament, șoarecii vor fi sacrificați după o perioadă de post de 6 ore. Probele de sange vor fi colectate pentru analize biochimice ale serului. Ficatul va fi rapid excizat pentru studii biochimice, histologice și de expresie.

#### **Histologie**

##### **Incorporarea și secționarea țesuturilor:**

Feliile de ficat au fost fixate mai întâi timp de 12 ore într-o soluție de 4% formalină. Bucățile de ficat au fost apoi spălate 30 de minute în PBS și deshidratate în soluții de etanol (băi succesive la 70, 80, 95 și 100% etanol). Bucățile de ficat au fost incubate în trei băi diferite de xilen (Sigma-Aldrich cat# 534056), urmate de două băi în parafină lichidă (56 ° C). Bucățile de ficat au fost apoi introduse în stative care au fost umplute ușor cu Histowax® pentru a acoperi complet țesutul.

Blocurile de parafină care conțin bucățile de țesut au fost îndepărtate din stative și depozitate la temperatura camerei. Blocurile de ficat au fost tăiate în felii de 3 μm.

##### **Colorare roșie Picrosirius**

Secțiunile hepatice au fost deparafinizate, rehidratate și incubate timp de 15 minute într-o soluție de Fast Green FCF 0,1% (Sigma-Aldrich, cat # F7258) înainte de clătire într-o baie de acid acetic 0,5% (Panreac, cat # 131008.1611). Secțiunile hepatice au fost clătite în apă și incubate timp de 30 de minute într-o soluție de 0,1% roșu sirius (Direct Red 80, Fluka cat # 43665) în acid picric apos saturat (Sigma-Aldrich cat # P6744). Secțiunile hepatice au fost în cele din urmă deshidratate și montate folosind mediul CV Mount (Leica, cat # 14046430011).

##### **Examinări histologice**

Identitatea specimenului de ficat a fost orbită de examinator. Diapozitive virtuale au fost generate folosind scannerul Panoramic 250 de la 3D Histech. Folosind software-ul Quant Center (3D Histech, inclusiv modulele Pattern Quant și Histo Quant), au fost cuantificate zonele colorate cu colagen. Pe scurt, Pattern Quant a fost utilizat pentru a detecta structura țesutului relevant și pentru a măsura suprafața. Apoi, Histo Quant a fost utilizat pentru a detecta conținutul de colagen colorat și pentru măsurarea suprafeței totale și a procentelor, pe baza unei metode de prag de culoare. Zona fibrozei a fost exprimată ca procent de suprafață de colagen pe întregul țesut.

##### **Măsurarea conținutului de colagen hepatic**

Conținutul de colagen hepatic a fost determinat folosind kitul QuickZyme adecvat (Testul total de colagen, cat # QZB-totcol2). Testul se bazează pe detectarea hidroxiprolinei, care este un aminoacid neproteinogen care se găsește în principal în spirala triplă a colagenului. Astfel, hidroxiprolina din hidrolizatele tisulare pot fi utilizate ca măsură directă a cantității de colagen prezent în țesut (fără discriminare între procolagen, colagen matur și produși de degradare a colagenului).

Este necesară hidroliza completă a probelor de țesut în HCl 6M la 95 ° C înainte de dozarea hidroxiprolinei. Testul are ca rezultat generarea unui cromogen cu o absorbanță maximă la 570 nm. Rezultatele sunt exprimate ca mg de colagen / g de ficat.

##### **Evaluarea de NTZ in modelul BDL**

Ligarea chirurgicală a căilor biliare va fi efectuată la șobolani pentru a induce o coleastăză extrahepatică și ulterior fibroza hepatică. După o perioadă de recuperare de 2 săptămâni, animalele vor fi tratate cu NTZ la 30 sau 100 mg / kg / zi timp de una sau două săptămâni. În ultima zi de tratament, șoarecii vor fi sacrificați după o perioadă de post de 6 ore. Probele de sange vor fi colectate pentru analize biochimice ale serului. Ficatul va fi rapid excizat pentru studii biochimice, histologice și de expresie.

##### **Măsurarea concentrației plasmatice a acizilor biliari totali**

Concentrația plasmatică a acizilor biliari totali (TBA) a fost determinată folosind kitul Randox adecvat pentru analizorul automat Daytona (Randox, cat # BI 3863). În prezența de Thio-NAD, enzima 3-α hidroxisteroid dehidrogenază (3-α HSD) transformă acizii biliari în 3-ceto steroizi și Thio-NADH. Reacția este reversibilă și 3-α HSD poate converti 3-cetosteroizi și Thio-

NADFH-in acizi biliari și Thio-NAD. În prezența excesului de NADH, ciclul enzimei are loc în mod eficient și rata de formare de Thio-NADH este determinată prin măsurarea modificării specifice a absorbției la 405 nm. Rezultatele sunt exprimate în  $\mu\text{mol} / \text{l}$ .

#### Rezultate și concluzii:

5 Persistența anormală a miofibroblastelor diferențiate este o caracteristică a multor boli fibrotice. După leziuni hepatice, HSC în repaus suferă un proces de activare care se caracterizează printr-o diferențiere în miofibroblaste pozitive ( $\alpha$ -SMA). În încercarea de a găsi noi molecule antifibrotice, o bibliotecă de medicamente aprobate de FDA a fost selectată fenotipic într-un model de HSC uman activat cu citokina profibrogenă TGF $\beta$ 1. Nivelurile de  $\alpha$ -SMA, un semn distinctiv al leziunilor fibrotice, au fost utilizate pentru a evalua potența medicamentelor pentru a interfera cu procesul fibrotic. Campania de screening a condus la identificarea nitazoxanidei (NTZ), care a redus în funcție de doză nivelul de  $\alpha$ -SMA în HSC induse TGF $\beta$ . În general, NTZ a prezentat un IC<sub>50</sub> cuprins între 0,1 și 3 $\mu\text{M}$  (Fig. 1A). Deoarece se știe că NTZ este hidrolizată rapid într-un metabolit activ tizoxanidă (TZ) (Broekhuysen, Stockis și colab., 2000), acest metabolit a fost evaluat, de asemenea, pentru activitatea sa antifibrotică în HSC. TZ a prezentat un profil similar cu medicamentul părinte cu un IC<sub>50</sub> cuprins între 0,1 și 3 $\mu\text{M}$  (Fig. 1B). Alți markeri ai stimulării TGF $\beta$  au fost reduși de ambii compuși, inclusiv matricea extracelulară de colagen 1A1 (COL1A1) (Fig.2). Analizele de toxicitate au confirmat că nivelurile reduse de  $\alpha$ -SMA nu s-au datorat toxicității sau apoptozei de HSC (datele nu sunt prezentate).

20 NTZ și TZ au redus, de asemenea, nivelurile de  $\alpha$ -SMA în HSC activat TGF $\beta$  derivat de la șobolan (Fig.3). În plus, potențialul antifibrotic al NTZ și TZ a fost extins la fibroblaste derivate din alte țesuturi, inclusiv fibroblaste pulmonare umane normale (NHLF) (Fig.4), fibroblaste cardiace umane normale (Fig.5) și miofibroblaste intestinale umane (InMyoFib) (Fig.6). În toate aceste modele de fibroză, NTZ și TZ au prezentat efecte antifibrotice semnificative la o concentrație de 1 $\mu\text{M}$ .

25 Eficacitatea lui NTZ *in vivo* a fost evaluată într-un model experimental de fibroză hepatică indusă de dieta colesterolului CDAA. Administrarea orală cronică de Nitazoxanidă 10 mg / kg / zi a demonstrat proprietăți antifibrotice reflectate de un conținut de colagen hepatic semnificativ mai mic (Fig. 7) și a redus zona fibrozei hepatice prin examen histologic (Fig. 8).

30 În modelul *in vivo* de leziune hepatică indusă de CCl<sub>4</sub>, NTZ a prevenit creșterea patologică a concentrației circulante de TBA (Fig 09), care este un marker asociat cu colestaza (Chang 2013).

35 În concluzie, solicitantul a constatat activități antifibrotice și anticolestice neașteptate pentru agentul antiparazitar NTZ. Aceste rezultate demonstrează că NTZ și / sau metabolitul său activ TZ pot oferi beneficii terapeutice în bolile colestice și în mai multe tipuri de boli fibrotice.

#### REFERINTE

- Broekhuysen, J., A. Stockis, și colab. (2000). "Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man." *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(8): 387-394.
- 40 de Carvalho, L. P. S., C. M. Darby, și colab. (2011). "Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*." *ACS Med. Chem. Lett.* 2(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 849-854.
- Di Santo, N. și 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). Toate drepturile rezervate.): 16-21.
- 45 Dubreuil, L., I. Houcke, și colab. (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). Toate drepturile rezervate.): 2266-2270.
- 50 Finegold, S. M., D. Molitoris, și colab. (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." *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 281-286.
- Fox, L. M. și L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." *Clin. Infect. Dis.* 40(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 1173-1180.
- 55 Hemphill, A., J. Mueller, și colab. (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). Toate drepturile rezervate.): 953-964.
- 60 Hoffman, P. S., G. Sisson, și colab. (2007). "Antiparasitic drug nitazoxanide 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). Toate drepturile rezervate.): 868-876.
- Kendall, R. T. și C. A. Feghali-Bostwick (2014). "Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators." Front Pharmacol 5: 123.
- 5 Leask, A. (2007). "TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response." Cardiovasc Res 74(2): 207-212.
- Leask, A. și D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." FASEB J 18(7): 816-827.
- Megraudd, F., A. Occhialini, și colab. (1998). "Nitazoxanide, a potential drug for eradication of Helicobacter pylori with no cross-resistance to metronidazole." Antimicrob. Agents Chemother. 42(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 2836-2840.
- 10 Pankuch, G. A. și P. C. Appelbaum (2006). "Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species." Antimicrob. Agents Chemother. 50(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 1112-1117.
- 15 Rosenbloom, J., F. A. Mendoza, și colab. (2013). "Strategies for anti-fibrotic therapies." Biochim Biophys Acta 1832(7): 1088-1103.
- Rossignol, J.-F. (2014). "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent." Antiviral Res. 110(Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). Toate drepturile rezervate.): 94-103.
- 20 Rossignol, J. F. și R. Cavier (1975). 2-Benzamido-5-nitrothiazoles, S.P.R.L. Phavic, Belg.. 11 pp.
- Rossignol, J. F. și 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.
- 25

#### LISTA SECVENȚELOR

	<110> GENFIT	
30	<120> METODE DE TRATAMENT PENTRU BOLILE COLESTATICE ȘI FIBROTICE	
	<130> B2223PC00	
	<160> 4	
	<170> Brevet in versiunea 3.3	
	<210>	1
35	<211>	25
	<212>	ADN
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> primer	
40	<400>	1
	25 catgctcaac atctcccct tctcc	
	<210>	2
	<211>	25
	<212>	ADN
45	<213> artificial	
	<220>	
	<223> primer	
	<400>	2
	25 gggaaggtgt aatccgtctc cacag	
50	<210>	3
	<211>	20
	<212>	ADN
	<213> artificial	
	<220>	
55	<223> primer	
	<400>	3
	20 aggcgaacaa ggtgacagag	
	<210>	4
	<211>	19
60	<212>	ADN
	<213> artificial	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt;

4

19 gccaggagaa ccagcagag

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- P. PATRICK BASU ET AL: "Effects of triple-drug therapy with nitazoxanide, high-dose ribavirin and peginterferon-[alpha]-2a in patients with chronic hepatitis C", HEPATOLOGY RESEARCH, vol. 43, no. 6, 11 December 2012 (2012-12-11), pages 589-595, XP055302495, NL ISSN: 1386-6346, DOI: 10.1111/hepr.12013
- WO-A2-2007/081974
- KORBA ET AL: "Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 77, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 56-63, XP022405848, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2007.08.005

**(57) Revendicări:**

1. Compus selectat în grupul format din Nitazoxanidă (NTZ), Tizoxanidă (TZ) și glucuronidă Tizoxanidă (TZG) și o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ, TZ sau TZG, pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul unei tulburări colestatice sau fibrotice.

2. Compus pentru utilizare conform revendicării 1, care este selectat în grupul constând din NTZ și TZ și o sare acceptabilă farmaceutic de NTZ sau TZ.

3. Compus pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, cuprins într-o compoziție farmaceutică.

4. Compus pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 3, în care tulburarea fibrotică este selectată în grupul constând din fibroză la ficat, intestin, rinichi, piele, epidermă, endoderm, mușchi, tendon, cartilaj, inimă, pancreas, plămân, uter, sistem nervos, testicul, penis, ovar, glandă suprarenală, arteră, venă, colon, intestin (de exemplu intestin subțire), tract biliar, țesut moale (de exemplu, mediastin sau retroperitoneu), măduvă osoasă, articulație, ochi și stomac.

5. Compus pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 4, în care tulburarea fibrotică este selectată în grupul constând din fibroză la ficat, intestin, plămân, inimă, rinichi, mușchi, piele, țesut moale, măduvă osoasă, fibroză intestinală și articulară.

6. Compus pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 5, în care tulburarea fibrotică este selectată din grupul constând din steatohepatită nealcoolică (NASH), fibroză pulmonară, fibroză pulmonară idiopatică, fibroză a pielii, fibroză oculară, fibroză endomiocardică, fibroză mediastinală, mielofibroză, fibroză retroperitoneală, fibroză masivă progresivă, fibroză proliferativă, fibroză neoplazică, fibroză pulmonară consecutivă bolii inflamatorii cronice a căilor respiratorii (BPOC, astm, emfizem, plămânul fumătorului, tuberculoză), fibroză hepatică indusă de alcool sau medicamente, ciroză hepatică, fibroză hepatică indusă de infecție, fibroză indusă de radioterapie sau chimioterapie, fibroză sistemică nefrogenă, boala Crohn, colită ulcerativă, cheloid, infarct miocardic vechi, sclerodermie / scleroză sistemică, artrofibroză, unele forme de capsulită adezivă, colangiopatii fibroase cronice precum Colangită sclerozantă primară (PSC), Colangită biliară primară (PBC), atrezie biliară, colestază intrahepatică familială de tip 3 (PFIC3), fibroză periimplantativă și azbestoză.

7. Compus pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1 la 3, în care tulburarea colestatică este selectată în grupul constând din colangită biliară primară (PBC), colangită sclerozantă primară (PSC), colestază intrahepatică a sarcinii, colestază intrahepatică progresivă familială, atrezie biliară, colelitiază, colangită infecțioasă, colangită asociată cu histiocitoza celulelor Langerhans, sindrom Alagille, insuficiență ductală nesindromică, colestază indusă de medicamente și colestază asociată nutriției parenterale totale.

8. Compus pentru utilizare conform revendicării 7, în care tulburarea colestatică este PBC.

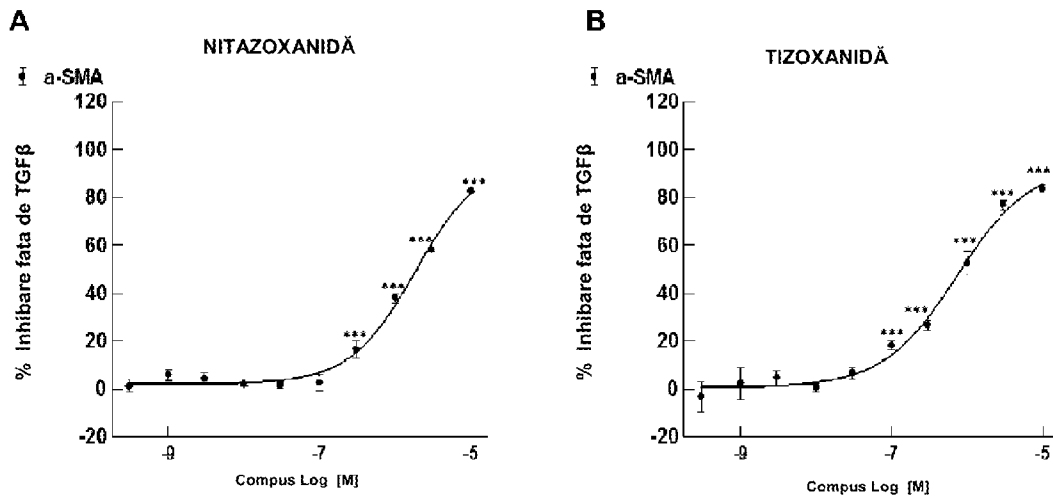


Fig. 1

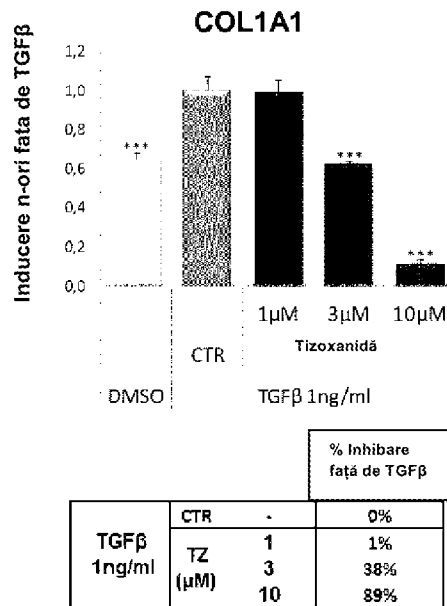


Fig. 2

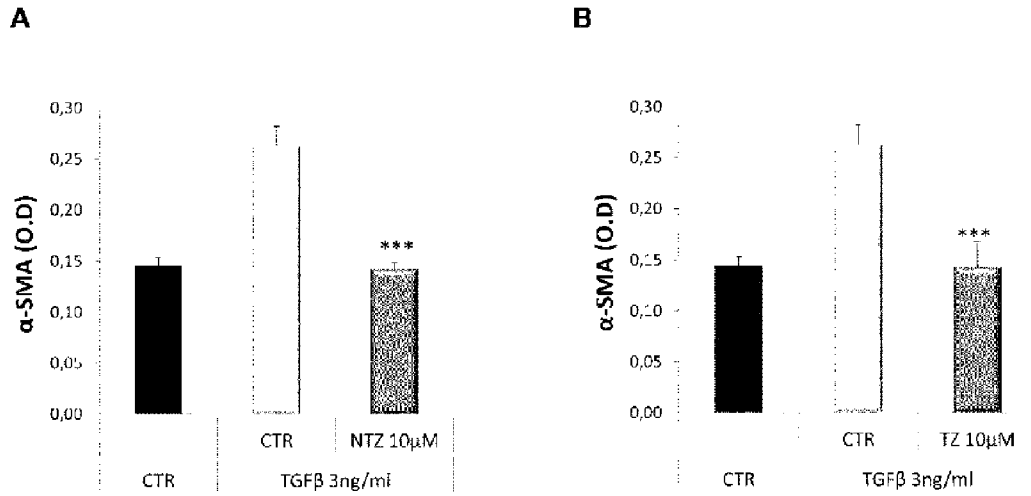


Fig. 3

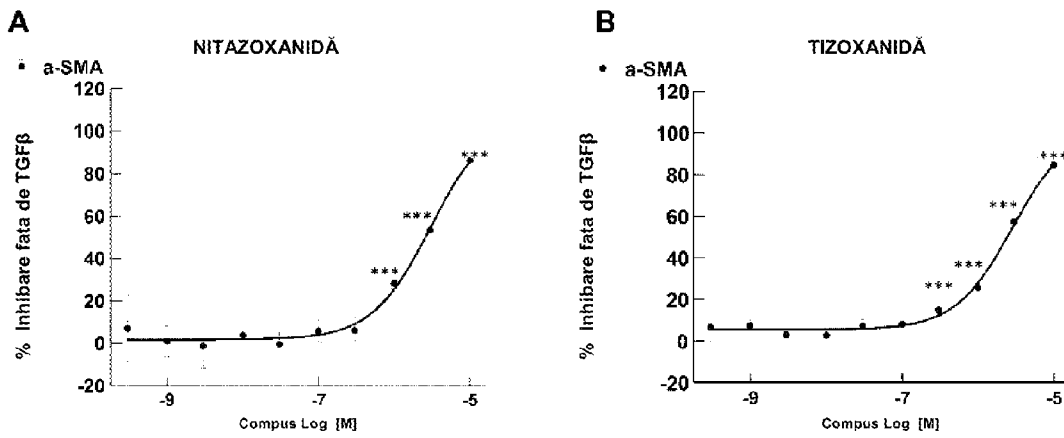


Fig. 4

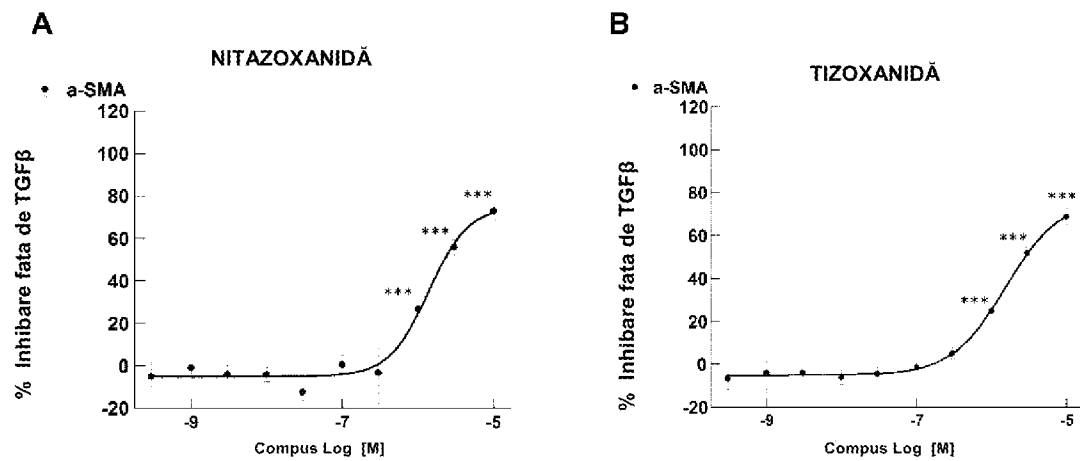


Fig. 5

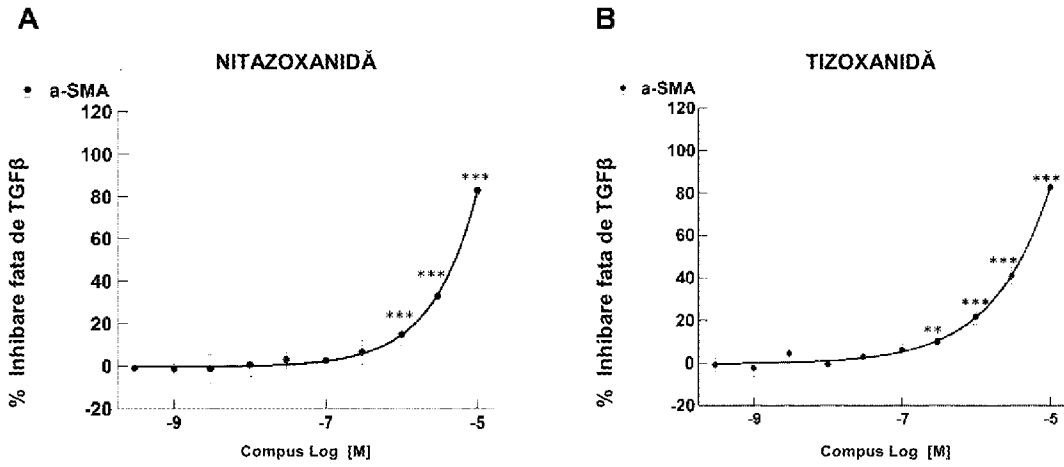


Fig. 6

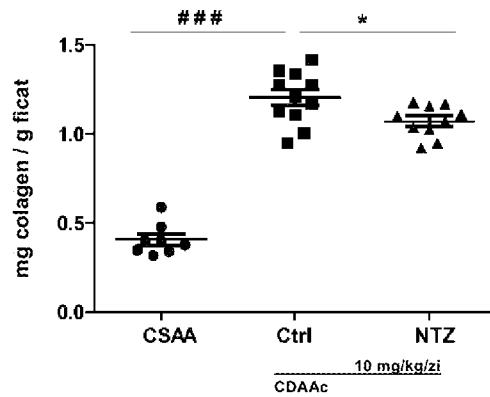


Fig. 7

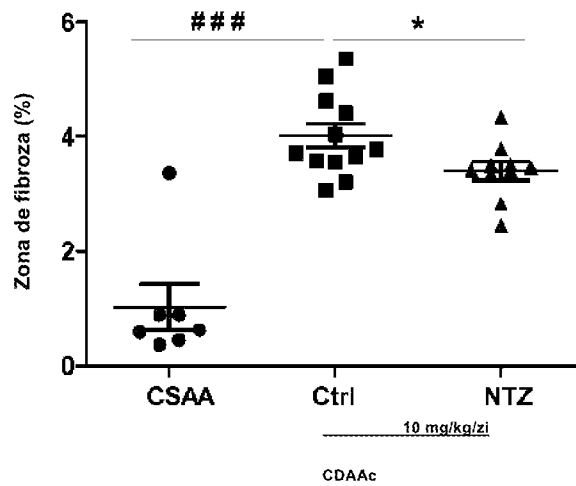
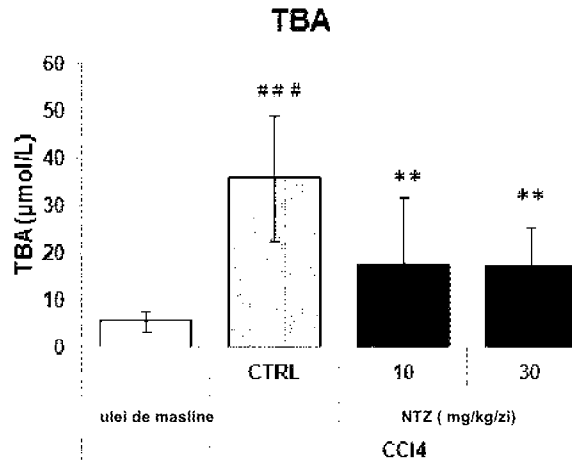


Fig. 8



**Fig. 9**